



**Pedro Francisco Moreira de Oliveira**

Licenciado em Ensino de Física e Química

**Influência dos fatores ambientais, de produção e do grau de amadurecimento nas propriedades antioxidantes e antimutagénicas de diferentes cultivares de *Vaccinium spp*, produzidas em Portugal**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Professora Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte,  
Professora Auxiliar, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes

Arguente: Doutora Ana Sofia Gregório Fernandes

Vogal: Prof. Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Março 2012**



**Pedro Francisco Moreira de Oliveira**

Licenciado em Ensino de Física e Química

**Influência dos fatores ambientais, de produção e do grau de amadurecimento nas propriedades antioxidantes e antimutagénicas de diferentes cultivares de *Vaccinium spp*, produzidas em Portugal**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Professora Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte,  
Professora Auxiliar, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes

Arguente: Doutora Ana Sofia Gregório Fernandes

Vogal: Prof. Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Março 2012**

### **Copyright – Pedro Francisco Moreira de Oliveira, UNL, FCT**

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

## **Agradecimentos**

À Professora Doutora Benilde Mendes, coordenadora deste Mestrado, por ter proporcionado todas as condições para a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Maria Paula Duarte pela excelente orientação científica, dedicação, apoio, total disponibilidade em todo o trabalho desenvolvido, pela amizade e ainda pela disponibilização do seu ar condicionado no dia mais quente do ano 3 dias depois da aventura do “*Stent*”. Muito obrigado por tudo.

Ao Professor Doutor José Rueff, Diretor do Departamento de Genética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, por ter disponibilizado as instalações e os equipamentos necessários à realização do ensaio ORAC.

Ao Doutor Fernando Matias (Cardiologista) pelo aumento da minha esperança de vida.

Às minhas colegas, de muitos trabalhos, Susana e Eugénia. Obrigado pela amizade, ajuda e, acima de tudo, paciência.

À empresa Mirtisul – Produção de Mirtilos Lda., localizada na Aldeia do Pico – Grândola, que generosamente me recebeu e disponibilizou as amostras da cultivar O’Neal, sem a qual não teria sido possível a realização deste trabalho.

À Mirtilusa, Sociedade de Produtores Hortofrutícolas, Sever do Vouga, por me terem recebido e disponibilizado as amostras das cultivares O’Neal e Earliblue, sem as quais não teria sido possível a realização deste trabalho.

À Direção do Agrupamento de Escolas Frei Estêvão Martins por me ter possibilitado, sempre, um horário compatível com a frequência deste mestrado.

Dedico este trabalho à minha família e amigos. Sem eles não havia este “mirtilo”.

## **Resumo**

O objetivo deste trabalho foi o de estudar as propriedades bioativas de duas variedades (O'Neal e Earliblue) de mirtilo produzidas na região de Sever do Vouga em diferentes fases de maturação e de uma mesma variedade (O'Neal), produzida na região de Grândola, em modo de agricultura biológica, e na região de Sever do Vouga, em modo de agricultura convencional. Para isso determinou-se o conteúdo em compostos fenólicos e antocianinas e avaliou-se a capacidade antioxidante e antimutagénica. Os resultados mostraram que todas as variedades possuem capacidade antioxidante e antimutagénica. Tanto a variedade Earliblue como a variedade O'Neal apresentaram, em estado de maturação de comercialização, um teor em fenóis totais e antocianinas mais elevado e uma capacidade antioxidante e antimutagénica mais acentuada do que quando em estado de maturação mais precoce.

Os fatores ambientais e/ou as técnicas de cultivo também influenciaram as propriedades bioativas dos frutos. Assim, a variedade O'Neal produzida na zona de Sever do Vouga apresentou maior teor em fenóis e antocianinas e maior atividade antioxidante na maioria dos ensaios realizados do que a mesma variedade produzida na região de região de Grândola. Contudo o estado de maturação parece ser um fator muito mais determinante para as propriedades bioativas dos mirtilos do que o seu local ou modo de cultivo.

**Palavras-chave:** Mirtilo, Atividade antioxidante, Atividade antimutagénica, Compostos fenólicos, Estado de maturação, Fatores ambientais.

## **Abstract**

The objective of this work was to study the bioactive properties of two varieties (O'Neal and Earliblue) blueberry produced in the region of Sever do Vouga at different stages of maturation and of the same variety (O'Neal), produced in the region of Grândola, organic farming mode, and Sever do Vouga region, either through conventional agriculture. For this content was determined in anthocyanins and phenolic compounds and evaluated the antioxidant capacity and antimutagenic. The results showed that all varieties have antioxidant and antimutagenic capacity. Both the varieties Earliblue and O'Neal presented, in maturation stage of commercialization, a higher content of total phenols and anthocyanins and a more pronounced antioxidant and antimutagenic capacity than when in a state of earlier maturation.

Environmental factors and/or cultivation techniques also influenced the properties of bioactive fruits. Thus, the variety O'Neal produced in the zone of Sever do Vouga had a higher content of phenols and anthocyanins and antioxidant activity in most tests than the same variety produced in the region of Grândola. However, the state of maturation seems to be a much more critical factor for the bioactive properties of blueberries than its place or mode of cultivation.

**Keywords:** Blueberries, antioxidant activity, antimutagenic activity, phenolic compounds, state of maturation, environmental factors.

# Índice de matérias

Introdução .....	1
1. Breve caracterização do mirtilo .....	4
1.1. Importância económica do mirtilo em Portugal .....	4
1.2. Variedades de mirtilo .....	5
1.3. Ciclo biológico do mirtilo .....	6
1.4. Informação nutricional do mirtilo .....	8
1.5. Fatores ambientais com influência na produção do mirtilo .....	9
1.5.1. O solo .....	9
1.5.2. Clima .....	10
1.5.3. Exposição solar .....	11
1.5.4. Necessidade de água .....	11
1.6. Fatores capazes de afetar o teor em antioxidantes no mirtilo .....	11
1.7. Caracterização climática e do solo na zona de Sever do Vouga e na zona da Aldeia do Pico .....	13
1.7.1. Temperatura .....	13
1.7.2. Solos .....	15
1.8. Algumas características das variedades de mirtilo estudadas .....	17
1.8.1. Variedade Earliblue .....	17
1.8.2. Variedade O'Neal .....	18
2. Antioxidantes e “Stress” oxidativo .....	19
2.1. Espécies reativas de oxigénio .....	19
2.2. Antioxidantes .....	21
2.3. Polifenóis .....	23
2.4. Mutagénicos e antimutagénicos alimentares .....	26
2.4.1. Mutagénicos alimentares .....	28
2.4.2. Antimutagénicos alimentares .....	30
3. Materiais e Métodos .....	32
3.1. Caracterização das amostras de mirtilo .....	32
3.2. Reagentes e meios de cultura .....	32
3.3. Preparação dos extratos de mirtilo .....	33
3.4. Determinação dos fenóis totais pelo Método de Folin-Ciocalteu .....	34

3.5 Quantificação das antocianinas monoméricas totais pelo método do pH diferencial .....	34
3.6. Determinação do teor de sólidos solúveis (grau Brix) .....	36
3.7. Avaliação da Capacidade Antioxidante .....	37
3.7.1. Determinação da capacidade de quelação de Fe(II) .....	37
3.7.2 Determinação da atividade de redução Fe(III) a Fe(II) pelo ensaio FRAP (“Ferric Reduction Antioxidant Power”) .....	37
3.7.3. Determinação da redução do Cu(II) pelo ensaio CUPRAC (“Cupric Reducing Antioxidant Capacity”) .....	38
3.7.4. Determinação do sequestro do peróxido de hidrogénio .....	40
3.7.5. Determinação do sequestro do radical anião superóxido .....	40
3.7.6. Determinação do resgate do radical peróxido pelo ensaio ORAC (“Oxygen Radical Absorbance Capacity”).....	42
3.8 Avaliação da atividade mutagénica e antimutagénica através do Teste de Ames .....	44
3.8.1. Caracterização da estirpe de <i>S. typhimurium</i> utilizada.....	45
3.8.2. Realização dos testes de Ames .....	45
3.9. Análise estatística dos dados .....	47
4. Resultados e discussão .....	48
4.1. Grau Brix.....	48
4.2. Determinação dos fenóis totais pelo Método de Folin-Ciocalteu.....	49
4.3. Quantificação das antocianinas monoméricas totais pelo método do pH diferencial .....	51
4.4. Atividade antioxidante das diferentes amostras de mirtilo.....	52
4.4.1. Determinação da capacidade de quelação de Fe (II) .....	52
4.4.2 Determinação da capacidade redutora pelos ensaios FRAP e CUPRAC .....	53
4.4.3. Determinação da atividade antioxidante por sequestro de ROS.....	54
4.5. Avaliação da atividade mutagénica e antimutagénica através do teste de Ames.....	56
4.6. Análise global aos resultados .....	58
5. Conclusão.....	61
6. Referências Bibliográficas.....	65



## Índice de figuras

<b>Figura 1.1:</b> Preços médios de importação e exportação por kg de alguns pequenos frutos a preços de 2006 .....	5
<b>Figura 1.2:</b> Esquema da planta do mirtilo em fase de dormência .....	7
<b>Figura 1.3:</b> Esquema de ramo frutífero de mirtilo. ....	8
<b>Figura 1.4:</b> Variação do teor em antocianinas em função do peso de mirtilo para 135 variedades “Lowbush” e 80 “Highbush” (incluindo as variedades O’Neal e Earliblue). ....	13
<b>Figura 1.5:</b> Valores de temperatura do ar, normais, climatológicos anuais em Aveiro entre 1981 e 2010 .....	14
<b>Figura 1.6:</b> valores de temperatura do ar, normais, climatológicos anuais em Setúbal entre 1981 e 2010 .....	14
<b>Figura 1.7:</b> (A) Tipo de solo na região de Sever do Vouga e (B) e na região de Grândola, segundo a Carta de Solos de 1978 da Comissão Nacional do Ambiente .....	15
<b>Figura 1.8:</b> Imagem de satélite das instalações da Mirtisul. ....	16
<b>Figura 1.9:</b> (A) acidez e alcalinidade dos solos na zona de Sever do Vouga e (B) na zona de Grândola, segundo a Carta de Acidez e Alcalinidade dos Solos de 1971 da Comissão Nacional do Ambiente ....	16
<b>Figura 1.10:</b> Frutos da variedade Earliblue. ....	17
<b>Figura 1.11:</b> Ramo com mirtilos da variedade O’Neal em diferentes estados de maturação. ....	18
<b>Figura 2.1:</b> Classificação de antioxidantes. ....	22
<b>Figura 2.2:</b> Compostos fitoquímicos, incluindo as principais classes de compostos fenólicos. ....	23
<b>Figura 2.3:</b> Benefícios dos compostos fitoquímicos em termos do aumento da probabilidade de se atingir o máximo da esperança de vida. ....	26
<b>Figura 2.4:</b> Papel dos mutagêneos alimentares na carcinogénese. ....	28
<b>Figura 2.5:</b> Papel dos antimutagêneos/anticancerígenos alimentares na prevenção da cancerogénese. ....	31
<b>Figura 3.1:</b> Formas estruturais predominantes de antocianinas presentes a diferentes valores de pH. ....	35
<b>Figura 3.2:</b> Características espectrais das antocianinas em soluções a pH 1,0 e a pH 4,5. ....	35
<b>Figura 3.3:</b> Formação do complexo ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ) após redução do $\text{Fe}^{3+}$ por um antioxidante. ....	38
<b>Figura 3.4:</b> Redução do complexo Cu(II)–neocuproína a Cu(I)–neocuproína, por ação de uma molécula antioxidante (HA) originando uma molécula de antioxidante oxidada ( $\text{A}^+$ ). ....	39
<b>Figura 3.5</b> - Redução do $\text{NBT}^{2+}$ (A) pelo radical anião superóxido, dando origem ao azul de formazano (B). ....	41
<b>Figura 3.6:</b> Formação do radical anião superóxido através do sistema PMS/NADH .....	41
<b>Figura 3.7:</b> Esquema para a decomposição do AAPH originando radicais peróxido. ....	42
<b>Figura 3.8:</b> Mecanismos propostos para a oxidação da fluoresceína pelo radical peróxido. ....	43

**Figura 4.1:** Curvas de dose-resposta das amostras O’Neal\_MS\_M (**OMSM**), O’Neal\_ML\_M (**OMLM**), Earliblue\_ML\_M (**EMLM**), O’Neal\_ML\_V (**OMLV**) e Earliblue\_ML\_V (**EMLV**) na presença (-x-) e na ausência (-•-) de t-BHP, na estirpe TA100. ....57

**Figura 4.2:** Percentagem máxima de inibição da mutagenicidade do t-BHP exercida pelas amostras O’Neal\_MS\_M (**OMSM**), Earliblue\_ML\_M (**EMLM**) e O’Neal\_ML\_M (**OMLM**). ....58

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1.1:</b> Evolução da produção de mirtilo em Portugal de 2004 a 2010 segundo dados da FAO .....	4
<b>Tabela 1.2:</b> Valor nutricional do mirtilo .....	8
<b>Tabela 1.3:</b> Conteúdo em flavonoides de mirtilos cultivados. ....	9
<b>Tabela 1.4:</b> Efeitos no conteúdo em fenóis totais, antocianinas e capacidade antioxidante de alguns fatores pré colheita .....	12
<b>Tabela 1.5:</b> Efeito do sistema de cultura (biológico ou convencional) no teor em fenóis totais, antocianinas e valores de ORAC em mirtilos da variedade Bluecrop.....	12
<b>Tabela 2.1:</b> Espécies radicalares e não radicalares de oxigénio. ....	20
<b>Tabela 2.2:</b> Principais classes de polifenóis.....	24
<b>Tabela 2.3:</b> Níveis de HPAs encontrados em amostras ambientais, biológicas e em alimentos. ....	29
<b>Tabela 3.1:</b> Composição da gelose de superfícies por litro .....	46
<b>Tabela 3.2:</b> Composição do meio VB.....	46
<b>Tabela 4.1:</b> Abreviaturas utilizadas para designar as várias amostras estudadas.....	48
<b>Tabela 4.2:</b> Valores de Grau Brix das amostras estudadas.....	49
<b>Tabela 4.3:</b> Teor em Fenóis totais expresso por 100 g de fruto, das amostras em estudo. ....	49
<b>Tabela 4.4:</b> Teor em Antocianinas totais expresso por 100 g de fruto, das amostras em estudo. ....	51
<b>Tabela 4.5:</b> Valores obtidos nos ensaios FRAP e CUPRAC expressos por 100 g de fruto. ....	53
<b>Tabela 4.6:</b> Atividade antioxidante por sequestro de espécies reativas de oxigénio .....	55
<b>Tabela 4.7:</b> Classificação da correlação em função do coeficiente de correlação de Pearson. ....	58
<b>Tabela 4.8:</b> Coeficiente de Pearson para as correlações entre composição química e atividade antioxidante e antimutagénica das várias amostras.....	59

## Listas de abreviaturas

**AAPH** - 2,2'-Azobis(2-metilpropionamidina) dihidroclorato

**A** - Adenina

**ác** - ácido

**AGEs** - produtos finais de glicosilação avançada

**ALEs** - compostos avançados da oxidação lipídica

**ATP** - Trifosfato de adenosina

$\lambda$  - Comprimento de onda

**C** - Citosina

**CUPRAC** - Cupric Reducing Antioxidant Capacity

**ADN** - Ácido desoxirribonucleico

**EDTA** - Sal disódico de ácido etilenodiaminatetracético

**Earliblue\_ML\_M** - variedade Earliblue produzida na Mirtilusa em estado de maturação de comercialização

**Earliblue\_ML\_V** - variedade Earliblue produzida na Mirtilusa em estado de maturação precoce (verde)

**eq** - Equivalente

**FRAP** - Ferric Reduction Antioxidant Power

**HAT** - Hydrogen atom transfer (transferência de um átomo de hidrogénio)

**HPA** - Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

**IARC** - International Agency for Research on Cancer

**LDL** - Lipoproteínas de baixa densidade

**MDA** - Malonildialdeído

**NB** - Meio de cultura Nutrien Broth

**NBT** - Azul de nitrotetrazólio

**NADH** - Dinucleotídeo de adenina e nicotinamida na forma reduzida

**NADPH** - Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida nm – Nanómetro

**NHB** - Northern High Bush

**NHPA** - Derivados Nitrados de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

**O'Neal\_ML\_M** - variedade Oneil produzida na Mirtilusa em estado de maturação de comercialização

**O'Neal\_ML\_V** - variedade Oneil produzida na Mirtilusa em estado de maturação precoce (verde)

**O'Neal\_MS\_M** - variedade Oneil produzida na Mirtisul em estado de maturação de comercialização

**ORAC** - Oxygen Radical Absorbance Capacity

**PMS** - Metossulfato de fenazina

**ROS** - Espécies reativas de oxigénio rpm - Rotações por minuto

**SET** - Single electron transfer (transferência de um eletrão)

**SHB** - Southern High Bush

**SOD** - Superóxido dismutase

**TBA** - Ácido tiobarbitúrico

**t-BHP** - tert-Butil-hidroperóxido

**TPTZ** - 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina

**USDA** - National Nutrient Database for Standard Reference

**UV** - ultra violeta

## Introdução

Uma saúde adequada não se traduz unicamente na ausência de doenças mas também num estado de satisfação e vitalidade que possibilite a cada ser humano desfrutar os prazeres da vida, independentemente da idade. Uma boa saúde depende, em grande parte, de uma nutrição equilibrada (Lidon & Silvestre, 2010). Uma alimentação saudável (uma dieta equilibrada ou balanceada) está associada a três princípios: diversidade, moderação e equilíbrio. Daqui resulta a importância da qualidade dos alimentos e o respeito pelas quantidades de porções recomendadas para cada grupo de alimentos (Lidon & Silvestre, 2010). O conceito de "nutrição ideal" inclui o potencial que os alimentos apresentam para a promoção da saúde e do bem-estar geral através, por exemplo, da redução do risco de desenvolvimento de determinadas doenças (Viuda-Martos *et al.*, 2008) como a diabetes, a osteoporose, as doenças cardiovasculares ou diversos tipos de cancro (Bhathena & Velásquez, 2002, Kris-Etherton *et al.*, 2002). Neste contexto tem vindo a aumentar o interesse pelos alimentos ditos funcionais que englobam os alimentos que, de forma natural, ou após modificação, possuem componentes com atividade fisiológica que apresentam benefícios para a saúde, para além da sua função nutritiva básica. Dentro destes, os alimentos que apresentam elevado potencial antioxidante têm vindo a ser bastante estudados.

A evolução de processos metabólicos aeróbicos, como, por exemplo, a respiração, levou à produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), em diversas estruturas celulares, como, por exemplo, as mitocôndrias ou os peroxissomas. Essas ROS têm demonstrado capacidade para causar danos em diversas biomoléculas, como, por exemplo, proteínas, ácidos nucleicos ou lípidos (Apel & Irt, 2004; Migliore & Coppède, 2009). Para conseguir lidar com as ROS, os organismos possuem diversos sistemas de defesa, que podem ser de natureza enzimática ou não enzimática. No entanto, quando as defesas naturais do organismo são vencidas por uma excessiva geração de ROS ocorrem situações de “*stress*” oxidativo, que podem levar ao aparecimento de lesões oxidativas passíveis de comprometer o correto funcionamento das células, órgãos e tecidos (Halliwell & Gutteridge, 1989; Halliwell & Aruoma, 1991 citados em Apak *et al.*, 2005). Os danos celulares causados por “*stress*” oxidativo têm sido implicados no desenvolvimento de diversas patologias, tais como, doenças cardiovasculares, doenças de Alzheimer e Parkinson, diabetes e cancro (revisto em Valko *et al.*, 2007).

Estudos epidemiológicos têm indicado que um maior consumo de antioxidantes naturais (ácido ascórbico, vitamina E, carotenoides e polifenóis) na dieta diária pode proteger contra doenças cardiovasculares, cataratas, cancro e problemas relacionados com o envelhecimento (Steffen *et al.*, 2003). As bagas têm demonstrado conter concentrações elevadas de compostos bioativos como polifenóis, incluindo antocianinas, ácidos fenólicos e taninos, vitamina A, C, E, ácido fólico e minerais

como cálcio, selênio e zinco (Kresty *et al.*, 2001; Pineli *et al.*, 2011 citados por Bunea *et al.*, 2011). Os mirtilos, em particular, contêm elevados níveis de antocianinas e outros compostos fenólicos com grandes capacidades antioxidantes *in vitro* comparando com outros frutos (Wang & Jiao, 2000). Para além da sua atividade antioxidante, os mirtilos, ou compostos isolados a partir deles, têm, igualmente, demonstrado possuir atividade anti-inflamatória, antibacteriana e anticancerígena, atividades que podem, de alguma forma, estar relacionadas com as suas características antioxidantes (Duthie, 2007; Neto, 2007; Zafra-Stone *et al.*, 2007). O conteúdo em compostos fenólicos dos mirtilos, e, desta forma, as suas propriedades funcionais, dependem das diferenças genéticas existentes entre as várias cultivares, das condições de solo e clima do local de cultivo, das técnicas utilizadas na sua produção e do grau de maturação do fruto (Zadernowski *et al.*, 2005).

Desde há muito anos que os mirtilos têm vindo a ser utilizados na medicina tradicional sendo utilizados no tratamento de cálculos da bexiga, desordens biliares, tosse, escorbuto, tuberculose pulmonar, entre outras patologias (Valentová *et al.*, 2007). Em ensaios realizados em animais de laboratório, os mirtilos, têm demonstrado possuir potencial para reduzir processos neuro degenerativos relacionados com a idade, melhorar as funções cognitivas e motoras (Joseph *et al.*, 2005 e Shukitt-Hale *et al.*, 2007), por processos que parecem envolver, não só o seu potencial antioxidante e anti-inflamatório, mas também a alteração da sinalização celular e da comunicação neuronal (Joseph *et al.*, 2007). Em ensaios *in vitro* realizados com linhas celulares de mamíferos, os mirtilos têm demonstrado, igualmente, conter compostos que mimetizam o efeito da insulina, oferecendo assim proteção contra a diabetes (Martineau *et al.*, 2006).

A produção de mirtilo em Portugal teve início na zona de Sever do Vouga nos anos 90 do século passado. Neste momento a sua produção está concentrada nas zonas de Sever do Vouga (Sociedade de Produtores Hortofrutícolas Mirtilusa) e Grândola (Mirtisul - Produção de Mirtilos, Lda.) acompanhando uma tendência mundial de aumento da extensão da área cultivada e da produção. No entanto, devido a fatores competitivos (económicos e outros), os produtores nacionais terão que realizar um esforço na diferenciação do seu produto ao nível da qualidade uma vez que dificilmente conseguirão competir a nível do preço e quantidade com outros produtores europeus ou americanos. Nesse sentido é de extrema importância a partilha de vontades e saberes que possam contribuir para uma melhor qualidade dos frutos produzidos (aspeto, cor, paladar, valor biológico, compostos orgânicos desejáveis e indesejáveis), nomeadamente, na sua composição fitoquímica para a maximização das suas propriedades antioxidantes e antimutagénicas. Este trabalho teve, assim, como objetivo avaliar o efeito do solo, clima e técnica de cultivo nas capacidades antioxidantes e antimutagénicas de uma mesma variedade de mirtilos, em concreto a variedade O'Neal, produzida na Mirtilusa (Sever do Vouga) e na Mirtisul (Grândola). Este trabalho teve ainda como objetivo comparar a capacidade antioxidante e antimutagénica de duas variedades de mirtilo (Earliblue e O'Neal) produzidas pela Mirtilusa em dois graus de maturação diferentes (fase final de maturação e numa fase

mais precoce). Nesse sentido, após a recolha dos frutos, procedeu-se à preparação das amostras e à determinação do seu teor em fenóis totais, antocianinas e açúcares totais. A capacidade antioxidante das amostras foi avaliada recorrendo aos ensaios de capacidade de redução do Cu(II) (ensaio CUPRAC) e do Fe(III) (ensaio FRAP), sequestro do peróxido de hidrogénio, radical anião superóxido e radical peroxilo (ensaio ORAC) e ainda, capacidade de quelação do Fe(II). O potencial antimutagénico foi avaliado através da inibição da mutagenicidade do mutagénico oxidativo tert-butil-hidroperóxido (t-BHP). Tentou-se ainda estabelecer uma correlação entre o conteúdo em compostos fenólicos, em particular em antocianinas, o conteúdo em açúcares e as atividades antioxidante e antimutagénica detetadas.

## 1. Breve caracterização do mirtilo

### 1.1. Importância económica do mirtilo em Portugal

A produção nacional de mirtilo começou há cerca de 20 anos, fruto de um desafio lançado pela Fundação holandesa Lockorn que efetuou experiências nos concelhos de Sever do Vouga e Trancoso no sentido de determinar se estas localidades possuíam as condições indicadas para garantir a produção precoce do mirtilo.

O número de produtores de mirtilos, bem como o total de produção nacional têm vindo a aumentar ao longo do tempo. Assim, o número de produtores que no final dos anos 90 não chegava a meia centena, agrupados na Mirtilusa atinge atualmente cerca de 120, na maioria de Sever do Vouga (<http://www.noticiasdeaveiro.pt/pt/20994/aumento-da-producao-de-mirtilo-impulsiona-cluster-dos-pequenos-frutos>, acedido em Janeiro de 2012). Para além de Sever do Vouga, existe igualmente produção de mirtilos no Alentejo, na Aldeia do Pico em Grândola, com cerca de 14 ha. Por outro lado, a produção de mirtilos na Mirtilusa foi de 120 toneladas em 2010, estimando-se que aumente em 2014 para 400 ou 500 toneladas. Este aumento da produção permitirá dar uma melhor resposta à forte procura estrangeira (prevê-se que cerca de 80% da produção possa ser escoada desta forma) e ao aumento do consumo nacional (<http://www.noticiasdeaveiro.pt/pt/20994/aumento-da-producao-de-mirtilo-impulsiona-cluster-dos-pequenos-frutos>, acedido em Janeiro de 2012). Prevê-se ainda que este incremento possa levar a uma diminuição dos custos logísticos associados à produção destes frutos.

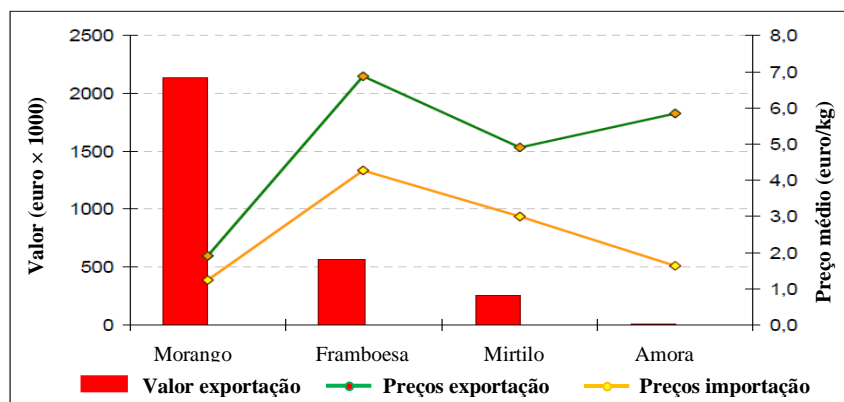
Segundo a FAO, no ano de 2010, o primeiro produtor mundial de mirtilos foram os Estados Unidos da América, encontrando-se Portugal no 17º lugar dos países produtores de mirtilo com uma produção anual total de 290 toneladas (<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>, acedido em Janeiro de 2012). A produção nacional tem vindo sempre a aumentar, sendo possível registar um incremento de cerca de 200% entre os anos de 2004 e 2010 (Tabela 1.1), sendo a maioria desta produção exportada para países da União Europeia, tais como a França, Holanda e Bélgica (Serrado *et al.*, 2012).

**Tabela 1.1:** Evolução da produção de mirtilo em Portugal de 2004 a 2010 segundo dados da FAO  
(<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>, acedido em Janeiro de 2012).

Ano	2004	2005	2006	2007	2008	2010
<b>Produção (toneladas)</b>	100	100	200	200	200	290



Comparando os valores dos preços médios de importação e de exportação de 2006 para o mirtilo em Portugal (Figura 1.1) verifica-se que o preço médio dos mirtilos exportados era superior, aproximadamente, em 2 euros por kg de fruto ([http://www.inrb.pt/fotos/editor2/inia/manuais/folha\\_sfp.pdf](http://www.inrb.pt/fotos/editor2/inia/manuais/folha_sfp.pdf), acedido em Janeiro de 2012).



**Figura 1.1:** Preços médios de importação e exportação por kg de alguns pequenos frutos a preços de 2006 ([http://www.inrb.pt/fotos/editor2/inia/manuais/folha\\_sfp.pdf](http://www.inrb.pt/fotos/editor2/inia/manuais/folha_sfp.pdf), acedido em Janeiro de 2012).

A nível mundial, verifica-se uma tendência para o aumento da área cultivada e da produção de mirtilo que deverá passar de 182 000 toneladas em 2005 para 636 000 toneladas em 2015 (<http://www.growingproduce.com/article/26272/trends-in-world-blueberry-production>, acedido em Janeiro de 2012). De 1970 a 2009 verificou-se um aumento do consumo de mirtilo nos Estados Unidos da América, tendência que parece estender-se a nível mundial com espaços de expansão significativos na China e Índia (Kaiser, 2010).

A cultura de pequenos frutos, como o mirtilo, pode, em várias regiões do nosso país, ser uma excelente alternativa à fruticultura tradicional. Portugal, devido à sua pequena dimensão, não pode competir em volumes de produção com os grandes produtores de mirtilo, mas pode ocupar uma razoável faixa de mercado com produções de qualidade, em especial se os custos de produção forem pouco elevados ([http://www.observatorioagricola.pt/item.asp?id\\_item=115](http://www.observatorioagricola.pt/item.asp?id_item=115), acedido em Janeiro de 2012).

## 1.2. Variedades de mirtilo

O mirtilo é uma planta frutífera que pertence à família *Ericaceae*, género *Vaccinium*. Existem entre 150 e 450 espécies de mirtilo diferentes. A maioria encontra-se nos trópicos em zonas elevadas, mas também em regiões temperadas e nas boreais. A espécie *Vaccinium myrtillus* apresenta-se,

maioritariamente, na forma de arbustos de tamanhos e formas variadas. É nativa da Europa do Norte, Rússia, Escandinávia e Pacífico Noroeste. As espécies mais importantes do ponto de vista económico são classificadas em “Northern Highbush”, “Rabbiteye”, “Lowbush”, “Southern Highbush” e “Half-high Highbush” (Rieger, 2006).

As plantas das variedades “Highbush” (“Northern” e “Southern”) apresentam-se sob a forma de arbustos sazonais que podem atingir os 1,2 a 2,1 metros de altura em cultivo e atingem uma produção máxima em cerca de 4 anos, começando a declinar em seguida. As folhas são pequenas (2,5 a 5,1 cm) ovais ou elípticas com pontas aguçadas. O fruto destas variedades tem cor azul escura apresentando uma qualidade frutífera boa a excelente. Estas variedades demoram entre 45 a 75 dias desde a floração até à maturidade do fruto (Rieger, 2006).

Nas variedades “Rabbiteye” os arbustos sazonais podem atingir alturas entre 1,2 a 3 metros, apresentando uma longevidade produtiva de cerca de 7 anos. As folhas são similares às variedades “Highbush”. O fruto destas variedades é azul-escuro e tem uma qualidade frutífera boa demorando cerca de 90 dias a atingir a maturidade a seguir à floração (Rieger, 2006).

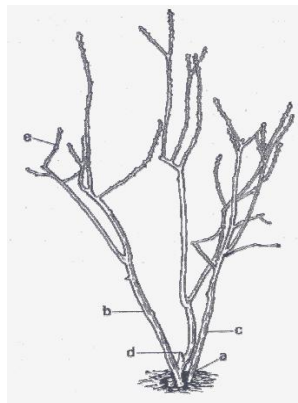
As variedades “Lowbush” atingem alturas, geralmente, menores que 0,6 metros, sendo arbustos com forma de rizoma que se propagam rente ao chão. Crescem de forma vegetativa durante o primeiro ano e dão fruto nos anos seguintes. As folhas são mais pequenas que as outras variedades e têm margens ligeiramente serradas. Os frutos têm uma cor que pode variar entre o preto e azul vivo apresentando uma fraca qualidade frutífera quando comparados com as outras variedades. Os períodos de maturação podem variar entre os 70 e os 90 dias (Rieger, 2006).

### **1.3. Ciclo biológico do mirtilo**

O mirtilo apresenta no seu ciclo biológico uma fase de dormência em que o crescimento do arbusto cessa por completo (Figura 1.2). Esta dormência pode ser classificada como quiescência ou como repouso, consoante os fatores que a desencadeiam. Assim, a quiescência resulta de fatores externos à planta, tais como, temperaturas excessivamente altas ou baixas, diminuição do comprimento do dia ou da intensidade luminosa ou ainda situações de carências hídricas. Este estado é passageiro e anula-se quando os estímulos externos desfavoráveis cessam (Fonseca & Oliveira, 2007).

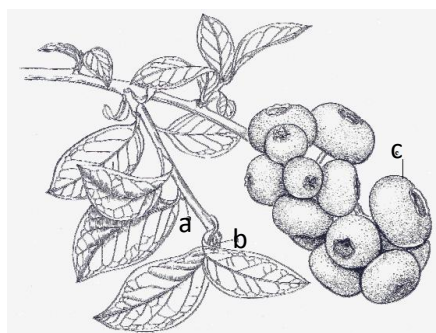
A fase de repouso é uma dormência fisiológica mantida por fatores endógenos. Quando estes fatores são desencadeados, a planta entra em repouso e, não retoma o crescimento, até que todas as condições internas tenham sido atingidas. A primeira fase do repouso ocorre no início do Outono. Nesta altura o crescimento dos ramos cessa, bem como a atividade no interior dos gomos florais e as plantas respondem cada vez menos aos estímulos externos. Em seguida, a planta entra num período de repouso profundo durante o qual a parte aérea não responde a qualquer alteração dos estímulos

externos (Fonseca & Oliveira, 2007). Durante esta fase os ramos têm de estar sujeitos a um certo número de horas abaixo de 7 °C para poderem retomar o crescimento, sendo que o número de horas necessárias à quebra da dormência de uma planta de mirtilo tem que ocorrer antes do fim do Inverno (Fonseca & Oliveira, 2007).



**Figura 1.2:** Esquema da planta do mirtilo em fase de dormência. **a** – Coroa; **b** – ramo principal; **c** – ramo de renovação; **d** – ramo podado; **e** – ramo lateral do ano com gomos e florais (Fonseca & Oliveira, 2007).

Na Primavera tem início o crescimento vegetativo que começa pelo abrolhamento dos gomos e prossegue com o crescimento dos ramos que se prolonga, em geral, até ao final do Verão. As folhas formam-se nos nós dos ramos e os gomos na axila de cada folha. Os mirtilos têm uma floração relativamente longa, que depende das suas características genéticas, sendo, no entanto também influenciada pela temperatura. As flores são aromáticas e possuem dezenas de óvulos nos ovários. Cada óvulo fertilizado irá dar origem a uma semente e quanto maior for o número de sementes, que se desenvolvem, maior será a dimensão e o peso do fruto. Os frutos do mirtilo são bagas que se formam a partir do desenvolvimento de um ovário (Figura 1.3). A maturação do fruto ocorre no período correspondente à terceira fase, durante o qual os tecidos amolecem, o teor em clorofila diminui e aumenta o teor em antocianinas e as bagas passam de verdes a azuis. Aumentam também, nesta fase, o teor em açúcares e outros componentes solúveis, a acidez diminui e a respiração decresce lentamente (Fonseca & Oliveira, 2007).



**Figura 1.3:** Esquema de ramo frutífero de mirtilo. **a** – gomo axilar; **b** – gomo terminal abortado; **c** – frutos (Fonseca & Oliveira, 2007).

## 1.4. Informação nutricional do mirtilo

A composição exata do fruto do mirtilo é condicionada por fatores genéticos, ambientais, tais como, a temperatura ou a intensidade da radiação ultravioleta, o tipo de solo e as condições de cultivo, tais como o grau de fertilização ou a disponibilidade em água (Giovanelli & Buratti, 2009).

**Tabela 1.2:** Valor nutricional do mirtilo (adaptado de USDA, 2010).

Valor nutricional por 100 g de parte edível	
Energia (kcal)	57,00
Proteínas (g)	0,74
Gorduras (g)	0,33
Hidratos de carbono (g)	14,49
Fibra (g)	2,40
Água (g)	84,21
Cálcio (mg)	6,00
Ferro (mg)	0,28
Magnésio (mg)	6,00
Manganésio (mg)	0,34
Fósforo (mg)	12,00
Potássio (mg)	77,00
Selénio (µg)	0,10
Sódio (mg)	1,00
Zinco (mg)	0,16
Vitamina C (mg)	9,70
Tiamina (mg)	0,04
Riboflavina (mg)	0,04
Niacina (mg)	0,42
Ácido pantoténico (mg)	0,12
Vitamina B-6 (mg)	0,05
Folato (µg)	6,00
Vitamina A (UI)	54,00
Vitamina E (mg EAT)	0,57

EAT- Equivalentes de  $\alpha$ -Tocoferol; UI-Unidades Internacionais

Apesar de todas estas condicionantes, os mirtilos têm baixo teor calórico e de açúcares, sendo ricos em fibra. Nestes frutos encontram-se, de uma forma geral, as vitaminas A, B, C e K, uma gama diversificada de minerais que inclui o cálcio, ferro, magnésio, fósforo, potássio, zinco, selénio e manganês (Tabela 1.2), encontrando-se ainda teores elevados de compostos fenólicos, em especial de antocianidinas (Tabela 1.3) (USDA, 2010 e 2011).

**Tabela 1.3:** Conteúdo em flavonoides de mirtilos cultivados (Adaptado de USDA, 2011).

Conteúdo em flavonoides mg/100 g de parte edível		
Classe	Flavonoide	Valores médios
Antocianidinas	Cianidina	7,10
	Delfinidina	30,91
	Malvidina	59,64
	Pelargonidina	0,00
	Peonidina	15,36
	Petunidina	28,02
Flavan-3-oís	(-) -Epicatequina	0,62
	(-) –Epicatequina 3-galato	0,00
	(-) –Epigallocatequina	0,66
	(-) –Epilgallocatequina 3-galato	0,00
	(+) -Catequina	5,29
	(+) -Galocatequina	0,12
Flavanonas	Hesperetina	0,00
	Naringenina	0,00
Flavonas	Apigenina	0,00
	Luteolina	0,20
Flavonóis	Canferol	1,66
	Miricetina	1,26
	Quercetina	7,67

## 1.5. Fatores ambientais com influência na produção do mirtilo

O local geográfico, o solo, clima e a disponibilidade de água são os principais fatores a considerar na cultura de mirtilos. O conhecimento das fases de crescimento e das necessidades das plantas é essencial para proporcionar as condições adequadas para se obter boas produções.

### 1.5.1. O solo

O sistema radicular dos mirtilos é muito superficial e compacto sendo constituído por raízes finas (fibrosas), com diâmetro inferior a 2 mm e raízes de suporte, com diâmetro entre 2 e 11 mm. As raízes finas distribuem-se nos primeiros 30 cm a 40 cm de profundidade e asseguram a absorção de água e nutrientes. As raízes de suporte podem alcançar profundidades de cerca de 1 metro e são responsáveis pela fixação do arbusto ao solo. O mirtilo pode desenvolver simbioses com vários fungos do solo, cujas hifas se expandem, em parte, nas primeiras camadas de células das raízes e o restante,

no solo que as rodeia. Esta porção das hifas, que pode ter 2 cm a 2,5 cm de comprimento, assume o papel dos pelos radiculares assegurando a absorção de água e nutrientes (Fonseca & Oliveira, 2007).

Devido às particularidades do seu sistema radicular, ao contrário da maior parte das plantas, no mirtilo a distribuição de água e nutrientes, ao longo da planta, não ocorre de maneira uniforme. O sistema vascular das raízes e da parte aérea não se encontra totalmente interligado. Se a água e os nutrientes forem distribuídos de um dos lados da planta, então só esse lado se desenvolverá (Gough, 1991).

Uma vez que as raízes finas e fibrosas dos mirtilos têm pouca capacidade de penetração, as plantas apresentam melhor desenvolvimento em solos arenosos ou franco arenosos, não pedregosos e ricos em matéria orgânica, que proporcionem um bom arejamento e drenagem e que garantam que as raízes se possam espalhar. A existência de 20% a 30% de partículas de argila no solo favorece a sua retenção de água no Verão (Trehane, 2004). Estes solos também apresentam vantagens relativamente à proliferação dos fungos que vivem em simbiose com as raízes. Para evitar situações em que a temperatura do solo permaneça durante grande parte do dia a temperaturas superiores a 20 °C, pode recorrer-se ao empalhamento com casca de pinheiro, serraduras, polietileno, ou outros materiais, como forma de ensombrar o solo, manter as temperaturas na faixa de maior atividade radicular e garantir uma uniformidade na humidade do solo. Os valores de pH do solo devem variar entre 4,5 e 5,5 pois o habitat natural das principais espécies de mirtilo usadas no melhoramento estarem adaptadas a solos ricos em turfa, em matéria orgânica e terem pH baixo (Fonseca & Oliveira, 2007).

### **1.5.2. Clima**

Os fatores climáticos afetam de forma diferente a planta, dependendo da fase de desenvolvimento em que esta se encontra condicionando, por essa via, a capacidade de produção. Durante a fase de repouso vegetativo, o frio é o fator mais relevante. Para a planta ter um período suficiente de dormência, tem que passar um longo período de tempo a cerca de 7 °C. A maioria das cultivares não é afetada por temperaturas de Inverno de -18°C, desde que não passem por grandes variações térmicas (Trehane, 2004). Os requisitos médios em termos de frio (temperatura inferior a 7 °C) são os seguintes: “Northern highbush” entre as 800 e as 1100 horas; “Rabbiteye” entre as 350 e as 800 horas; “Southern highbush” entre as 200 e as 700 horas; “Lowbush” mais de 1000 horas (Rieger, 2006).

Na fase vegetativa os fatores climáticos mais influentes são a temperatura, a precipitação e a radiação solar. As plantas são vulneráveis aos ventos frios tardios da Primavera que possam ocorrer após a abertura das flores. Temperaturas acima dos 30 °C no Verão podem levar à morte das folhas, principalmente em cultivares de rápido crescimento vegetativo que estejam completamente expostas

ao sol. A estas temperaturas as raízes não conseguem absorver água suficiente para compensar as perdas por transpiração levada a cabo pelas folhas (Trehane, 2004).

### **1.5.3. Exposição solar**

O arbusto do mirtilo é uma planta que “gosta” de sol. As parcelas que se encontram expostas a Sul recebem mais incidência solar, pelo que os riscos de geada são menores. A orientação das linhas deve ser, sempre que possível, Norte-Sul (Trehane, 2004).

### **1.5.4. Necessidade de água**

Depois de ser plantado e ao longo dos quatro a cinco primeiros anos de cultura, o mirtilo exige um aprovisionamento regular em água para se desenvolver e frutificar normalmente. Nos períodos de maior calor, especialmente se as partes terminais dos ramos das plantas começarem a murchar, torna-se necessário regar as plantas, por vezes duas vezes por dia. Na fase de formação do fruto a necessidade de água é crítica e, após a colheita, a deficiência em água pode comprometer a produção do ano seguinte. Uma vez que as raízes do mirtilo não possuem pelos radiculares que lhes proporcionem uma maior área de absorção, esta característica deve ser tida em conta quando se efetua a rega (Trehane, 2004).

## **1.6. Fatores capazes de afetar o teor em antioxidantes no mirtilo**

Diversos fatores têm sido descritos como sendo capazes de condicionar o teor em compostos antioxidantes presentes nos frutos do mirtilo. Dentro destes fatores encontram-se fatores endógenos, ou seja, os fatores genéticos característicos das diferentes cultivares, e também fatores exógenos, como, por exemplo, o clima ou as condições de cultivo. Desta forma, é possível verificar, para uma mesma variedade, variações no perfil de compostos antioxidantes entre locais de produção ou entre épocas de produção. Os estados de maturação e as condições de armazenamento são mais dois fatores que parecem, igualmente, afetar a composição em antioxidantes dos mirtilos (Tabela 1.4), (<http://ddr.nal.usda.gov/bitstream/10113/3159/1/IND43938883.pdf>, acedido em Janeiro de 2012).

Os fatores genéticos, que variam com as cultivares, influenciam a composição química e a qualidade do fruto (Skupień, 2006), sendo exemplo disso a variação do conteúdo em fenóis totais e antocianinas presente entre diferentes cultivares. Em mirtilos selvagens (*V. myrtilus*) o conteúdo em fenóis totais foi determinado com sendo duas a três vezes superior ao presente em quatro variedades de *V. corymbosum* (Goldtraube, Patriot, Bluecrop, Darrow) cultivadas e comercializadas em Itália, apresentando os mirtilos selvagens uma atividade antioxidante aproximadamente igual ao dobro da dos mirtilos cultivados (Giovanelli & Buratti, 2009).

**Tabela 1.4:** Efeitos no conteúdo em fenóis totais, antocianinas e capacidade antioxidante de alguns fatores pré colheita (<http://ddr.nal.usda.gov/bitstream/10113/3159/1/IND43938883.pdf>, 2012).

<b>Fatores pré colheita</b>	<b>Compostos fenólicos</b>	<b>Antocianinas</b>	<b>Capacidade antioxidante</b>
Aumento da temperatura ou da intensidade de luz	Aumento	Aumento	Aumento
Adição de composto ao solo	Aumento	Aumento	Aumento
Cultura biológica ou sustentável	Aumento ou mantém	Aumento	Aumento
Adição de matéria orgânica e cobertura de plástico preto	Aumento	Aumento	Aumento
Solo arenoso com fertilizante rico em cálcio, magnésio e azoto	Aumento	Aumento	Aumento
Aumento de CO <sub>2</sub> atmosférico	Aumento	Aumento	Aumento
Pulverizado com jasmonato de metilo	Aumento	Aumento	Aumento
<b>Fatores de maturação</b>			
Da fase verde à rosa	Aumento ou diminuição	Aumento	Aumento ou diminuição
Da fase rosa à fase vermelha	Aumento, mantém ou diminuição	Aumento	Aumento

Quanto às condições de cultura e métodos de produção, verificou-se que os mirtilos da variedade Bluecrop, quando cultivados nas mesmas condições de solo e clima em agricultura biológica apresentavam quantidades significativamente maiores de fenóis totais e de antocianinas e uma mais elevada ação antioxidante, medida pelo ensaio de sequestro do radical peroxilo (ensaio ORAC (“Oxygen Radical Absorbance Capacity”), do que quando cultivados em agricultura convencional (Tabela 1.5) (Wang *et al.*, 2008).

**Tabela 1.5:** Efeito do sistema de cultura (biológico ou convencional) no teor em fenóis totais, antocianinas e valores de ORAC em mirtilos da variedade Bluecrop (Wang *et al.*, 2008).

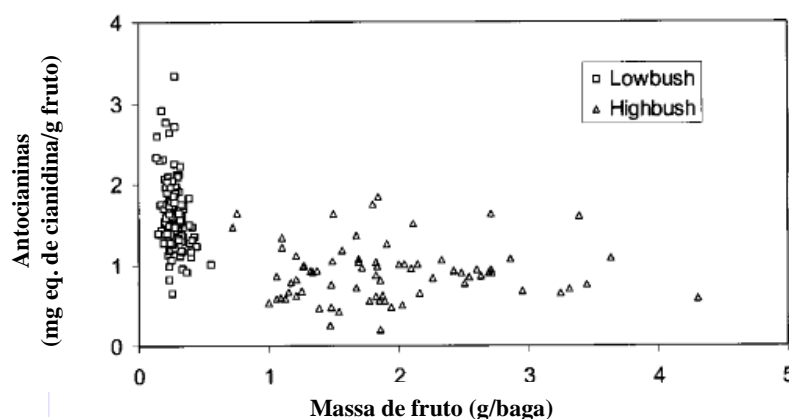
	<b>Cultura biológica</b>	<b>Cultura convencional</b>
<b>Fenóis totais (mg/100g de fruto)</b>	319,3	190,3
<b>Antocianinas (mg/100g de fruto)</b>	131,0	82,36
<b>ORAC (µmol Trolox equivalente/g de fruto)</b>	46,14	30,76

Durante a fase de amadurecimento, a concentração em antocianinas e fenóis totais também sofre uma variações perceptível, por exemplo, através das mudanças de cor dos frutos que refletem um aumento dos teores de antocianinas. Prior e colaboradores (1998) verificaram que frutos da cultivar Brightwell colhidos logo após terem adquirido a cor azulada e outros colhidos 49 dias depois, apresentavam um aumento nos valores de ORAC, antocianinas e fenóis totais de 224%, 261% e 169%, respetivamente. Kalt e colaboradores (2003) verificaram em três cultivares de “Highbush Blueberry” (Bergitta, Bluegold e Nelson), um aumento substancial do teor em antocianinas durante a fase de



maturação. Estes autores verificaram um deslocamento do “pool” de fenóis totais no sentido da síntese de antocianinas mantendo-se, no entanto, a capacidade antioxidante sensivelmente constante, sugerindo que tanto os fenóis corados como aqueles sem cor possam contribuir para a capacidade antioxidante nas diferentes fases de maturação (Kalt *et al.*, 2003; Kalt, 2005).

Apesar das variedades de mirtilo “Lowbush” e “Highbush” apresentarem pigmentos apenas na película e não na polpa, o tamanho do fruto, avaliado pelo peso, parece não ter relação com o teor em antocianinas (Figura 1.4) (Kalt *et al.*, 2001).



**Figura 1.4:** Variação do teor em antocianinas em função do peso de mirtilo para 135 variedades “Lowbush” e 80 “Highbush” (incluindo as variedades O’Neal e Earliblue) (Kalt *et al.*, 2001).

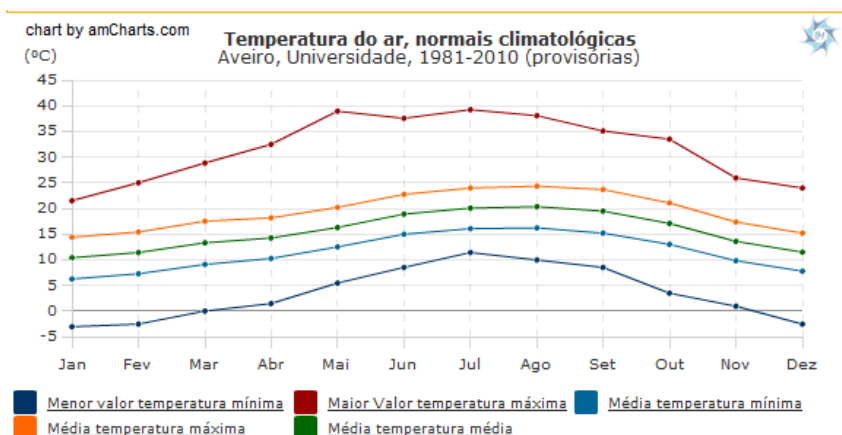
## 1.7. Caracterização climática e do solo na zona de Sever do Vouga e na zona da Aldeia do Pico

Em Portugal a produção de mirtilos é efetuada maioritariamente nas zonas de Sever do Vouga (Mirtilusa) e da Aldeia do Pico (Mirtisul). Devido à ausência de valores climáticos oficiais para as zonas de produção de Sever do Vouga e da Aldeia do Pico, recorreu-se a valores para a zona de Aveiro e de Setúbal por serem as regiões que se situam mais perto geograficamente de Sever do Vouga e da Aldeia do Pico, respetivamente. Por esta razão é possível que algumas das caracterizações possam sofrer variações próprias de cada local.

### 1.7.1. Temperatura

Na região de Aveiro, a variação dos valores de temperatura do ar, normais, climatológicos (Figura 1.5) para a média da temperatura mínima permite concluir que, em média, entre 1981 e 2010, nos meses de Dezembro, Janeiro e Fevereiro existem condições para se registarem temperaturas do ar inferiores ou iguais a 7 °C. Nos meses de Janeiro, Fevereiro, Março e Dezembro a média da temperatura mínima registou valores inferiores ou iguais a 0 °C.

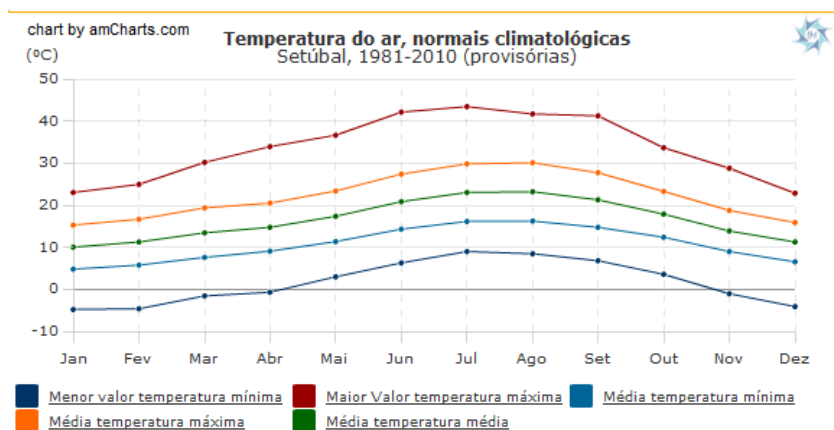
A média da temperatura máxima do ar atingiu os seus valores máximos nos meses de Julho, Agosto e Setembro aproximando-se dos 25 °C, tendo-se registado valores máximos de temperatura máxima superiores ou iguais a 35 °C nos meses de Maio a Setembro.



**Figura 1.5:** Valores de temperatura do ar, normais, climatológicos anuais em Aveiro entre 1981 e 2010 (<http://www.meteo.pt/pt/oclima/normais.clima/1981-2010/001>, acedido em Janeiro de 2012).

Na região de Setúbal, a variação dos valores de temperatura do ar, normais, climatológicos (Figura 1.6) para a média da temperatura mínima permite concluir que, em média, entre 1981 e 2010, nos meses de Dezembro, Janeiro e Fevereiro existem condições para se registarem temperaturas do ar inferiores ou iguais a 7 °C. Nos meses de Janeiro, Fevereiro, Março e Dezembro a média da temperatura mínima registou valores inferiores ou iguais a 0 °C.

A média da temperatura máxima do ar atingiu os seus valores máximos nos meses de Junho, Julho, Agosto e Setembro, aproximando-se dos 30 °C, tendo-se registado valores máximos de temperatura máxima superiores ou iguais a 35 °C nos meses de Maio a Setembro.

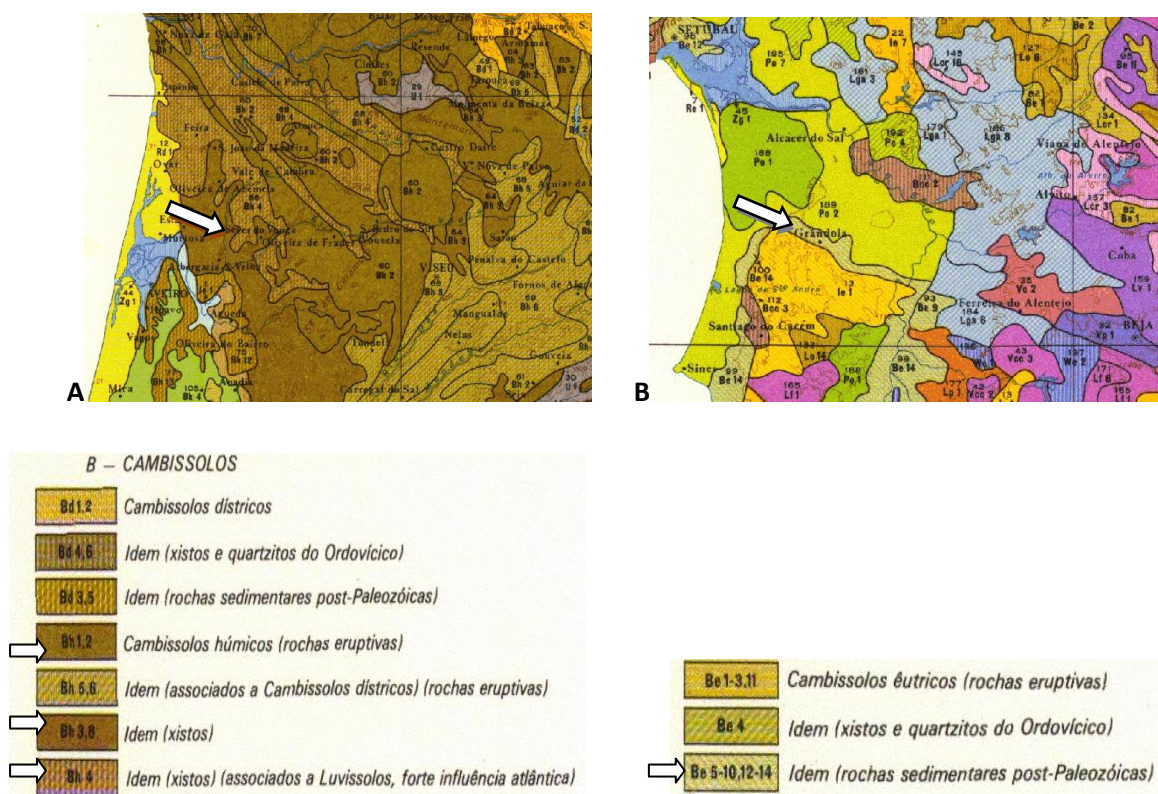


**Figura 1.6:** valores de temperatura do ar, normais, climatológicos anuais em Setúbal entre 1981 e 2010 (<http://www.meteo.pt/pt/oclima/normais.clima/1981-2010/019/>, acedido em Janeiro, 2012).

A comparação das figuras 1.5 e 1.6 permite verificar que os valores da média da temperatura mínima são semelhantes na região de Aveiro e de Setúbal ocorrendo os valores mais baixos nos meses de Dezembro, Janeiro e Fevereiro em ambos os casos. Relativamente à média da temperatura máxima, a região de Setúbal apresenta valores mais elevados durante mais tempo que a região de Aveiro. Setúbal também apresenta valores absolutos de temperatura máxima mais elevados.

### 1.7.2. Solos

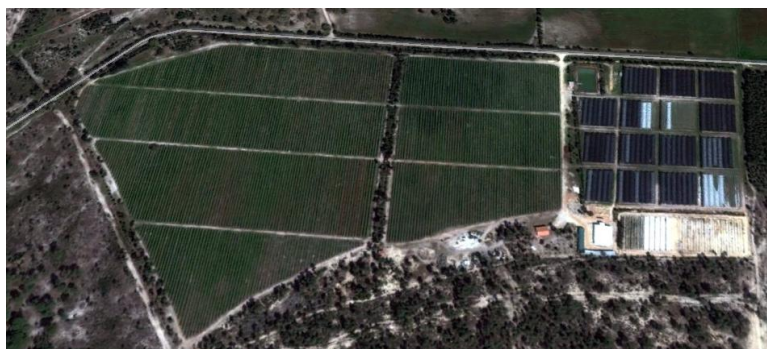
A caracterização dos solos foi realizada recorrendo às Cartas de Solos e às Cartas de Acidez e Alcalinidade dos Solos emitidas pela Comissão Nacional do Ambiente e impressas pelo Instituto Hidrográfico em 1978 e 1981, respetivamente, dado que não foi possível a confirmação por parte de um dos produtores.



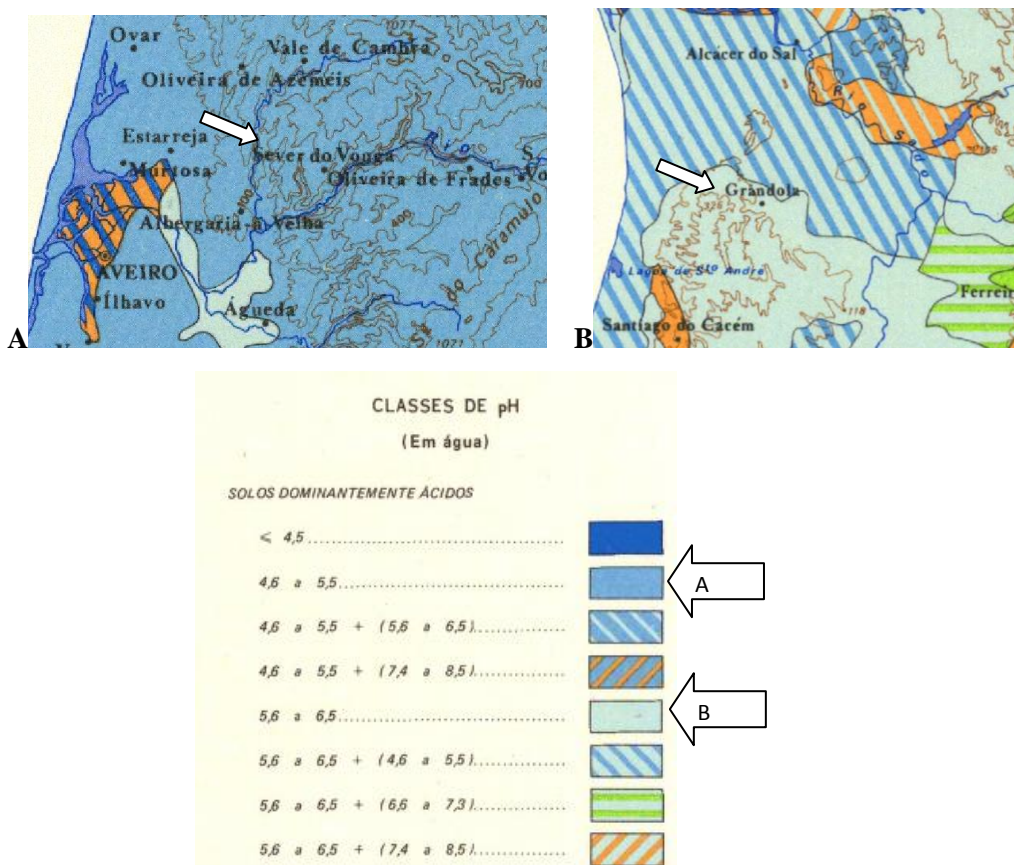
**Figura 1.7:** (A) Tipo de solo na região de Sever do Vouga e (B) e na região de Grândola, segundo a Carta de Solos de 1978 da Comissão Nacional do Ambiente (<http://sniamb.apambiente.pt/webatlas/>, acedido em Janeiro de 2012).

De acordo com a Carta de Solos, na região de Sever do Vouga (Mirtilusa) os solos são do tipo cambissolos húmicos (rochas eruptivas, xistos e xistos associados a Luvisolos) (Figura 1.7A) que originam solos com capacidades agrícolas mas pobres em nutrientes. Na região da Aldeia do Pico (Mirtisul), os solos são do tipo cambissolos éutricos (rochas sedimentares post-paleozoicas) (Figura

1.7B) que, em zonas temperadas, estão entre os mais produtivos (<http://www.fao.org/DOCREP/003/Y1899E/y1899e08.htm#TopOfPage>, acedido em Janeiro 2012). O local de produção da Mirtisul ocupa a área de um antigo pinhal (Figura 1.8).



**Figura 1.8:** Imagem de satélite das instalações da Mirtisul (Google Earth).



**Figura 1.9:** (A) acidez e alcalinidade dos solos na zona de Sever do Vouga e (B) na zona de Grândola, segundo a Carta de Acidez e Alcalinidade dos Solos de 1971 da Comissão Nacional do Ambiente (<http://sniamb.apambiente.pt/webatlas/>, acedido em Janeiro de 2012).



Os solos na zona de Sever do Vouga são predominantemente ácidos, apresentando valores de pH entre 4,6 e 5,5 (Figura 1.9A). Na zona da Aldeia do Pico, em Grândola, pela análise da carta de solos, estes também são predominantemente ácidos, apresentando um pH entre 5,6 e 6,5 (Figura 1.9B). No entanto, de acordo com informações fornecidas pelos responsáveis da Mirtisul, baseadas em análises efetuadas anualmente ao solo, o valor de pH, na camada superficial do solo, entre zero e 20 cm, varia entre 5,0 e 5,4, enquanto entre os 20 e os 50 cm de profundidade, varia entre 5,4 e 6,1.

## **1.8. Algumas características das variedades de mirtilo estudadas**

### **1.8.1. Variedade Earliblue**

A variedade Earliblue é classificada como “Northern Highbush Blueberry” (NHB). Apresenta um arbusto ereto, ramoso e aberto com tamanhos dos 1,2 aos 1,8 m. Adapta-se melhor a solos com pH entre 4,5 e 5,5 necessitando de estar mais de 1000 horas anuais exposto a temperaturas inferiores a 7 °C. O fruto (Figura 1.10) é de tamanho médio a grande e doce. O seu período de amadurecimento medeia entre a quarta semana de Junho e a segunda semana de Julho ([http://www.fallcreeknursery.com/documents/uploads/Ripening\\_Chart\\_poster.pdf](http://www.fallcreeknursery.com/documents/uploads/Ripening_Chart_poster.pdf), acedido em Janeiro de 2012).



**Figura 1.10:** Frutos da variedade Earliblue ([http://www.fallcreeknursery.com/nursery/variety/nursery\\_northern-highbush](http://www.fallcreeknursery.com/nursery/variety/nursery_northern-highbush), acedido em Janeiro de 2012).

### 1.8.2. Variedade O’Neal

A variedade O’Neal é classificada como um “Southern Highbush Blueberry” (SHB). O arbusto apresenta tamanhos entre 1,2 e 1,8 m, tendo uma forma ereta e ramosa. Esta variedade adapta-se melhor em solos com pH entre 5,0 e 5,5, tendo necessidades de 400 a 500 horas de temperaturas inferiores a 7 °C. O fruto (Figura 1.11) é grande e doce, apresentando cicatriz pequena e firme. O seu período de amadurecimento vai desde a quarta semana de Maio à segunda semana de Junho, datas relativas a Sever do Vouga ([http://www.mirtilusa.com/cat\\_a5\\_mirtilusa\\_2011.pdf](http://www.mirtilusa.com/cat_a5_mirtilusa_2011.pdf), acedido em Janeiro de 2012).



**Figura 1.11:** Ramo com mirtilos da variedade O’Neal em diferentes estados de maturação (foto tirada nas instalações da Mirtisul). **a**-mirtilo em fase de maturação de comercialização; **b**-mirtilo em fase mais precoce de maturação.

## 2. Antioxidantes e “Stress” oxidativo

A evolução de processos metabólicos aeróbicos, como, por exemplo, a respiração, levou à produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), em diversas estruturas celulares, como, por exemplo, as mitocôndrias ou os peroxissomas. Essas ROS têm demonstrado capacidade para causar danos em diversas biomoléculas, como, por exemplo, proteínas, ácidos nucleicos ou lípidos (Apel & Irt, 2004; Migliore & Coppedè, 2009). Para conseguir lidar com as ROS, os organismos possuem diversos sistemas de defesa, no entanto, quando essas defesas são vencidas por uma excessiva geração de ROS ocorrem situações de “stress” oxidativo.

O “stress” oxidativo representa um desequilíbrio no balanço entre a capacidade antioxidante dos sistemas biológicos e o seu potencial pró-oxidante. Este fenómeno pode resultar de uma diminuição da quantidade de antioxidantes devido a uma produção excessiva de espécies reativas de oxigénio (de origem endógena ou exógena) ou de uma alimentação deficiente. Quando um sistema biológico é sujeito a situações de “stress” oxidativo pode reagir aumentando a síntese dos sistemas de defesa antioxidante. No entanto, a exposição a condições de “stress” oxidativo mais severo pode levar a lesões oxidativas fisiopatológicas.

Tratando-se de um sistema biológico aeróbio complexo, o corpo humano necessita de oxigénio molecular para gerar trifosfato de adenosina (ATP), ou seja, para obter a energia necessária para a sua manutenção. No entanto, devido ao seu poder oxidante e à ocorrência de reações secundárias que originam ROS, o oxigénio pode tornar-se tóxico e mutagénico.

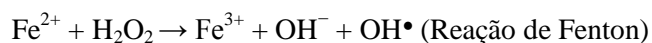
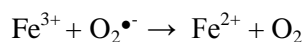
### 2.1. Espécies reativas de oxigénio

As espécies reativas de oxigénio (ROS) (Tabela 2.1) incluem espécies radicalares, como, por exemplo, radical anião superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) ou o radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ), e espécies não radicalares, como, por exemplo, o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) ou o oxigénio singlete ( $^1O_2$ ). Assim, todas as espécies tóxicas de oxigénio são ROS mas nem todas as ROS são radicais de oxigénio (Haliwell & Chirico, 1993; Sorg, 2004; Buoncore *et al.*, 2010).

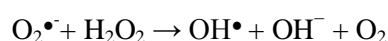
O radical anião superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ), são moléculas, altamente reativas, geradas dentro da célula como subprodutos do metabolismo e, em particular, como já foi anteriormente referido, da respiração aeróbia. O radical anião superóxido, resulta da redução do oxigénio molecular, é precursor da maioria das ROS e pode ser um mediador de

reações oxidativas em cadeia. A dismutação deste radical produz o peróxido de hidrogénio, que por sua vez pode ser reduzido a água e  $O_2$ , enquanto a sua protonação conduz ao aparecimento do radical hidroperoxilo ( $HOO\bullet$ ). Na presença de catiões de metais de transição, em especial do  $Fe^{2+}$  e o  $Cu^+$ , o radical anião superóxido e o peróxido de hidrogénio interagem na reação Haber-Weiss para gerar o radical hidroxilo, o qual parece ser o responsável pela maioria dos danos oxidativos (Al-Gubory *et al.*, 2010).

O ciclo de Haber-Weiss consiste nas seguintes reações:



A reação líquida:



Os radicais livres, por terem eletrões desemparelhados, são espécies químicas que apresentam grande reatividade uma vez que podem dar ou receber um eletrão para se tornarem quimicamente estáveis. O seu tempo de semivida é, geralmente, curto (Kohen & Nyska, 2002).

**Tabela 2.1:** Espécies radicalares e não radicalares de oxigénio (Kohen & Nyska, 2002).

Nome	Símbolo
<b>Radicais de oxigénio</b>	
Oxigénio (bi radical)	$O_2^{\bullet}$
Radical anião superóxido	$O_2^{\bullet-}$
Radical hidroxilo	$OH\bullet$
Radical peroxilo	$ROO\bullet$
Radical alcóxido	$RO\bullet$
Oxido nítrico	$NO\bullet$
<b>Derivados não radicalares de oxigénio</b>	
Peróxido de hidrogénio	$H_2O_2$
Hidroperóxidos orgânicos	$ROOH$
Ácido hipocloroso	$HOCl$
Ozono	$O_3$
Oxigénio singlete	$^1O_2$
Peroxinitrito	$ONOOH$

As espécies não radicalares possuem, geralmente, maior tempo de semivida, dependendo este tempo das espécies químicas, do pH ou da presença de outros compostos. As espécies com maior



tempo de semivida podem difundir-se e causar danos em alvos biológicos afastados do local onde foram produzidos (Kohen & Nyska, 2002).

Os danos celulares causados pelo “stress” oxidativo parecem contribuir para o processo de envelhecimento e para o desenvolvimento de patologias como doenças cardiovasculares, diabetes, cancro e doenças degenerativas como a aterosclerose, Alzheimer, Parkinson (revisto em Valko *et al.*, 2007) e esclerose lateral amiotrófica (Migliore & Coppedè, 2009, Al-Gubory *et al.*, 2010). As ROS também têm sido associadas a vários problemas durante a gravidez, como embriopatias, diminuição do crescimento fetal, aumento da taxa de partos prematuros ou de abortos espontâneos (Al-Gubory *et al.*, 2010) assim como algumas neoplasias relacionadas com mutações no Ácido desoxirribonucleico (DNA) que resultam de lesões oxidativas (Deaton & Marlin, 2003).

Para fazerem frente aos problemas criados pelas ROS, os organismos desenvolveram sistemas de defesa onde participam enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase) e antioxidantes como o  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico, ácido úrico, glutathione e outros maioritariamente assimilados pela alimentação (Aguiló *et al.*, 2005).

## 2.2 Antioxidantes

Um antioxidante é uma substância, que quando presente nos sistemas biológicos em baixas concentrações comparando com um determinado substrato, atrasa ou inibe significativamente a oxidação desse substrato (Halliwell & Gutteridge, 1989, citado em Magalhães *et al.*, 2008). Nesta categoria estão incluídos compostos enzimáticos e não enzimáticos (Sies, 1997).

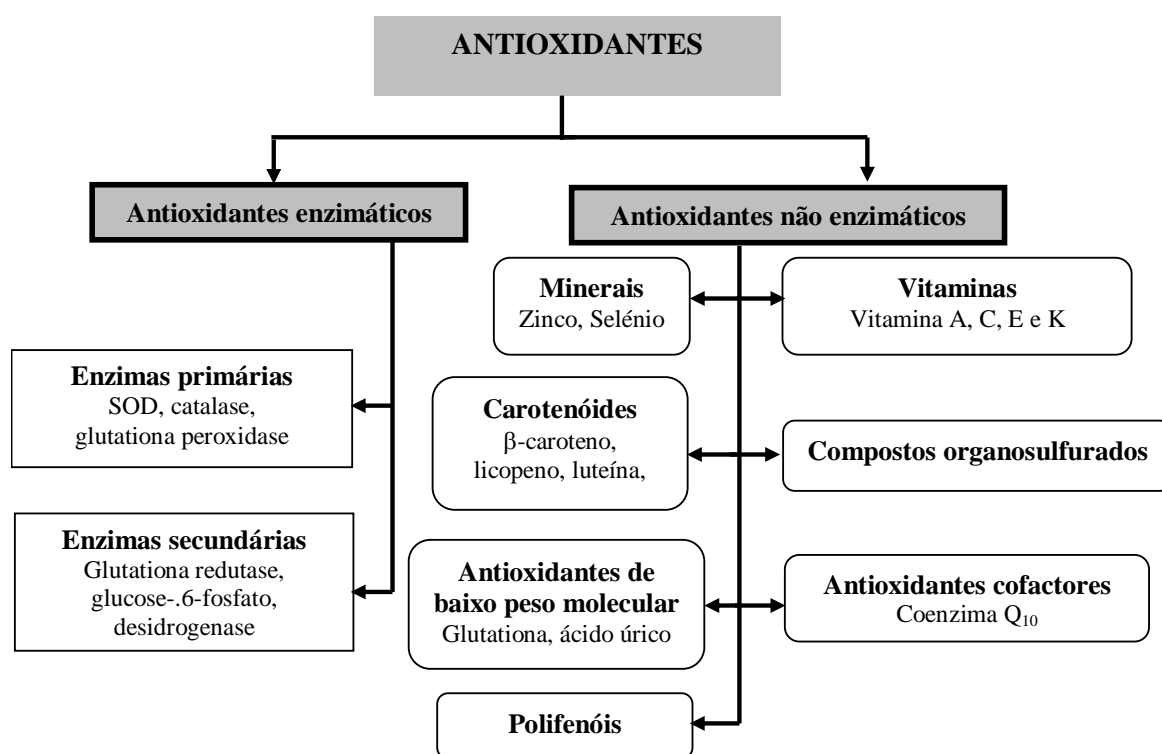
Os antioxidantes podem desempenhar a sua função através de diferentes processos (Prior *et al.*, 2005; Magalhães *et al.*, 2008):

- Descativação de espécies reativas através da transferência de um átomo de hidrogénio (mecanismo HAT - Hydrogen Atom Transfer) ou por transferência de eletrões (mecanismo SET - Single Electron Transfer).
- Capacidade de quelação de metais de transição, em especial o  $\text{Fe}^{2+}$  e o  $\text{Cu}^+$ , evitando, deste modo, a formação de radicais hidroxilo através das reações de Fenton.
- Indução das enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase ou glutathione peroxidase).
- Inibição de enzimas oxidativas como a xantina oxidase ou as ciclooxigenases.

Assim, as defesas antioxidantes englobam um variado leque de mecanismos protetores. Os antioxidantes, quando acumulados em quantidades apropriadas e em locais específicos ou

compartimentos especializados (como  $\alpha$ -tocoferol no lipoproteínas de baixa densidade plasmáticas ou nas membranas celulares), podem participar diretamente na inibição dos processos oxidativos. Contudo, estes compostos, também podem exercer um papel protetor ao sequestrarem radicais livres presentes nos alimentos e/ou que se formem durante a digestão gastrointestinal, reduzindo a formação dos potencialmente nocivos compostos avançados da oxidação lipídica (ALEs) ou produtos finais de glicosilação avançada (AGEs) (Holst & Williamson, 2008).

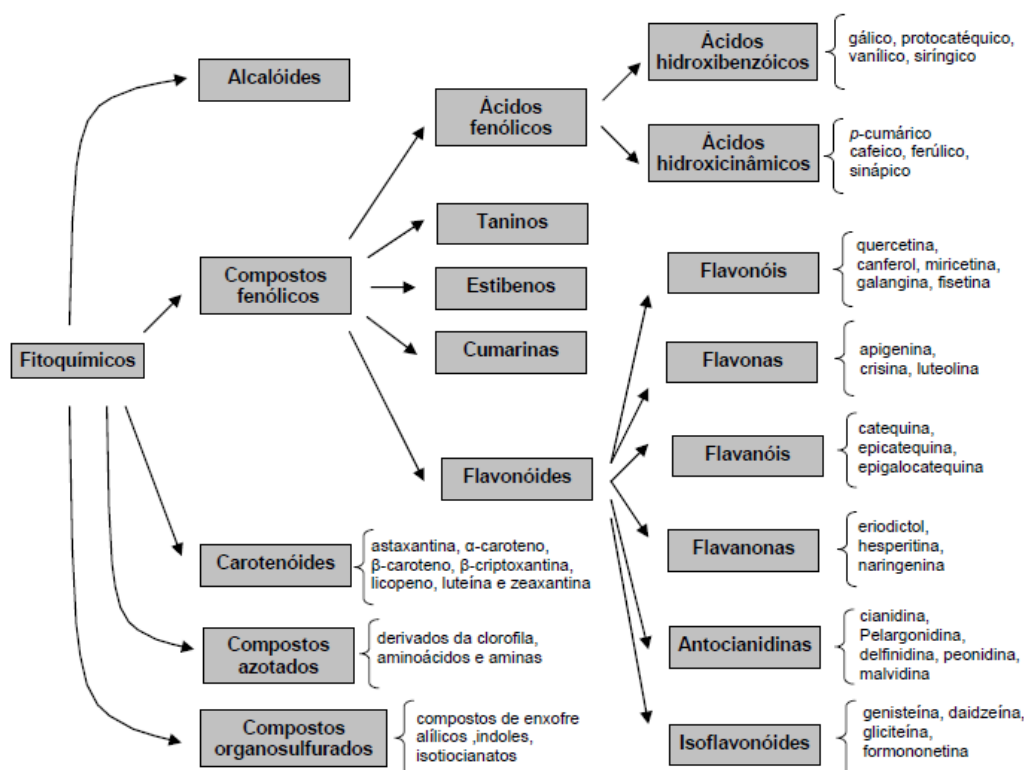
Os antioxidantes podem ser divididos em duas grandes classes: os enzimáticos e não os enzimáticos (Figura 2.1). Alguns são endógenos como enzimas, moléculas de baixo peso molecular, e cofatores enzimáticos. Entre os antioxidantes não enzimáticos muitos são obtidos por via alimentar, como é o caso dos polifenóis e das vitaminas, que formam as maiores classes destes compostos veiculados pela dieta, carotenoides, compostos organosulfurados e minerais (Ratnam *et al.*, 2006).



**Figura 2.1:** Classificação de antioxidantes (Ratnam *et al.*, 2006).

## 2.3. Polifenóis

Os polifenóis constituem uma das mais importantes famílias de compostos químicos que existem nas plantas, tendo já sido identificados mais de 8 000 estruturas diferentes (Ferguson & Philpott, 2008). Estes compostos fitoquímicos (Figura 2.2), têm origem no metabolismo secundário das plantas, formando-se em condições de “stress” como infeções, ferimentos, níveis elevados de radiação ultravioleta (Angelo & Jorge, 2006), ataques de organismos patogénicos ou herbívoros (Alvarez-Jubete *et al.*, 2010) e englobam: ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzóicos ou ácidos hidroxicinâmicos), flavonóides (flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas, antocianinas e isoflavonóides), estilbenos, cumarinas e taninos. Nesta família de compostos destacam-se os flavonóides e os ácidos fenólicos por constituírem os mais importantes subgrupos com mais de 5 000 compostos identificados (Hipólito-Reis, 2008) e pela maior relevância do seu poder antioxidante (Ferreira & Abreu, 2007).



**Figura 2.2:** Compostos fitoquímicos, incluindo as principais classes de compostos fenólicos (Ferreira & Abreu, 2007).

A tabela 2.2 mostra a estrutura básica das diferentes classes de polifenóis, bem como os principais alimentos onde estes podem ser encontrados.

**Tabela 2.2:** Principais classes de polifenóis (Ferguson, 2001).

Classe	Esqueleto básico	Exemplo	Fonte principal
<b>Ácidos hidroxibenzóicos</b>	C6-C1	Ácidos gálico, vanílico, siríngico, protocatéquico e tânico	Comum nas plantas superiores e fetos
<b>Ácidos hidroxicinâmicos</b>	C6-C3	Ácidos ferúlico, <i>p</i> -cumárico, cafeico e sinápico.	Comum nas plantas superiores, muitas vezes como componentes da parede celular
<b>Cumarinas, isocumarinas</b>	C6-C3	Umbeliferona, esculetina, escopoletina	-
<b>Estilbenos</b>	C6-C2-C6	Resveratrol	Especialmente na pele das uvas
<b>Antraquinonas</b>	C6-C2-C6	-	-
<b>Flavonóides</b>	C6-C3-C6	Apigenina, genistéina, canferol, epigallocatequina galato, miricetina, quercetina	Difundidos por todo o reino vegetal.
<b>Diarilheptanos</b>	C6-C7-C6	curcumina, iaquichinona A e B	Presentes no gengibre
<b>Lignanas</b>	(C6-C3) <sub>2</sub>	-	Comum nas sementes de linho
<b>Ligninas</b>	(C6-C3) <sub>n</sub>	-	Componentes das paredes celulares de diversas plantas (Fibra dietética)

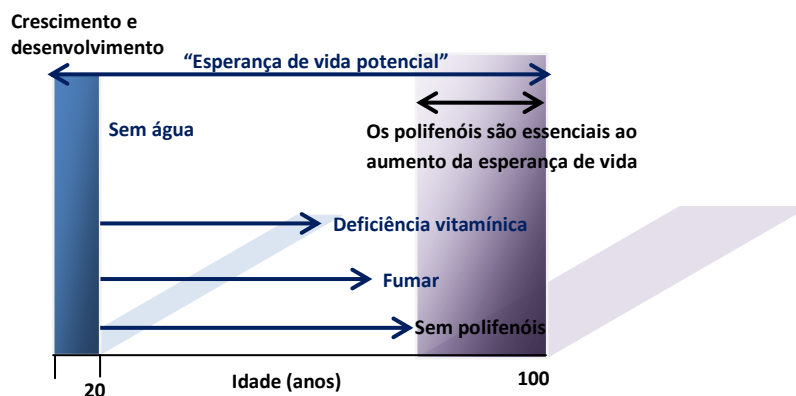
Uma das características mais referenciada dos polifenóis é a proteção contra danos oxidativos. A atividade antioxidante dos polifenóis tem sido principalmente associada à sua capacidade de sequestrar radicais livres. Esta atividade, ligada à proteção contra a peroxidação de lipoproteínas de baixa densidade, pode ser benéfica relativamente a doenças cardíacas. A proteção contra a oxidação do DNA pode estar relacionada com uma possível estabilização genómica e proteção contra efeitos cancerígenos. Alguns polifenóis podem, no entanto, induzir as enzimas antioxidantes ou enzimas de conjugação, como a glutathione-S-transferase, levando, desta forma, a um aumento da excreção de espécies oxidantes. Os polifenóis podem também inibir enzimas geradoras de ROS, tais como, os citocromos P450, as ciclooxygenases ou lipooxygenases, e quelar iões metálicos responsáveis pela produção do radical hidroxilo, através das reações de Fenton e de Haber-Weiss (Ferguson, 2001; Scalbert *et al.*, 2005).

Alimentos contendo polifenóis, extratos preparados a partir deles ou polifenóis constituintes de vários alimentos, têm mostrado estar relacionados com as suas propriedades bioativas, que, para além da atividade antioxidante, incluem, entre outras, atividade antimutagénica, anti-inflamatória, atividade antiestrogénica e atividade antimicrobiana (Nakasugi *et al.*, 2000; Ferguson, 2001; Gigante *et al.*, 2003; Lazarou *et al.*, 2007; Di Sotto *et al.*, 2009; Alvarez-Jubete *et al.*, 2010; Ramful *et al.*, 2010).

A extrapolação dos resultados obtidos com os polifenóis em ensaio *in vitro* para a realidade *in vivo* tem que ser efetuada com prudência, uma vez que a manutenção das propriedades verificadas *in vitro* depende de vários fatores, como, por exemplo, do facto dos compostos por elas responsáveis resistirem ao processo de digestão gastrointestinal, de serem absorvidos e não serem alterados pelas enzimas de biotransformação. Muitos dos compostos fenólicos presentes nos alimentos são fracamente absorvidos pelo intestino. Contudo, ensaios efetuados em voluntários humanos sugerem que mesmo essa pequena quantidade possa ser suficiente para exercer efeitos benéficos *in vivo*. Da mesma forma, estudos epidemiológicos têm demonstrado uma relação entre o elevado consumo de antioxidantes de origem fenólica e o reduzido risco de doença cardiovascular assim como uma redução de certos tipos de cancro (Ferguson, 2001).

São cada vez mais os resultados que sugerem o potencial dos fitoquímicos alimentares para a manutenção de uma vida saudável e diminuição do risco de doenças crónicas, em especial durante a vida adulta e durante o envelhecimento. Desta forma, é possível que, estes compostos acabem por ser essenciais para que se atinja o máximo da esperança de vida, isto é, é possível que os fitoquímicos aumentem a probabilidade de se atingir o tempo máximo de vida geneticamente determinado, aumentando a qualidade de vida durante o envelhecimento, com base na diminuição da redução dos riscos de doenças crónicas (Figura 2.3) (Holst & Williamson, 2008).

A contrastar com os já referidos impactes positivos na saúde, alguns polifenóis demonstraram possuir atividade mutagénica e/ou efeitos pró-oxidantes (Ferguson, 2001). Esta atividade pode resultar da sua capacidade para reduzir os iões Fe(III) a Fe(II), podendo levar à formação de radicais hidroxilo através das reações de Fenton e de Haber-Weiss (Perro & Burmaghim, 2009). Alguns ensaios em animais de laboratório têm sugerido que os polifenóis possam apresentar atividade mutagénica e pró-carcinogénica. No entanto, a grande maioria deste tipo de ensaios apontam no sentido contrário, podendo as enzimas de biotransformação limitar os efeitos mutagénicos dos polifenóis *in vivo* (Scalbert *et al.*, 2005).



**Figura 2.3:** Benefícios dos compostos fitoquímicos em termos do aumento da probabilidade de se atingir o máximo da esperança de vida. Por definição, os nutrientes, vitaminas e minerais são necessários para o crescimento e para o desenvolvimento, bem como para a manutenção das funções básicas do corpo. Vários fatores exógenos podem afetar a vida útil sendo a ausência de água o mais extremo de todos. A deficiência em vitaminas pode ser letal, depois de semanas a meses de carência enquanto o fumo afeta a expectativa de vida e mais frequentemente a qualidade de vida depois de anos ou décadas de exposição. A exposição aos fitoquímicos dietéticos pode reduzir o risco de doenças crônicas na vida adulta podendo, desta forma, contribuir para que se consiga atingir o tempo de vida geneticamente determinado (Holst & Williamson, 2008).

## 2.4. Mutagêneos e antimutagêneos alimentares

A alimentação é uma das principais vias de exposição do Homem a diferentes compostos que podem ter efeitos mutagênicos e/ou carcinogênicos, pois podem induzir mutações no DNA e/ou favorecer o desenvolvimento de tumores, enquanto outros podem atenuar ou anular estes efeitos (Antunes & Araújo, 2000).

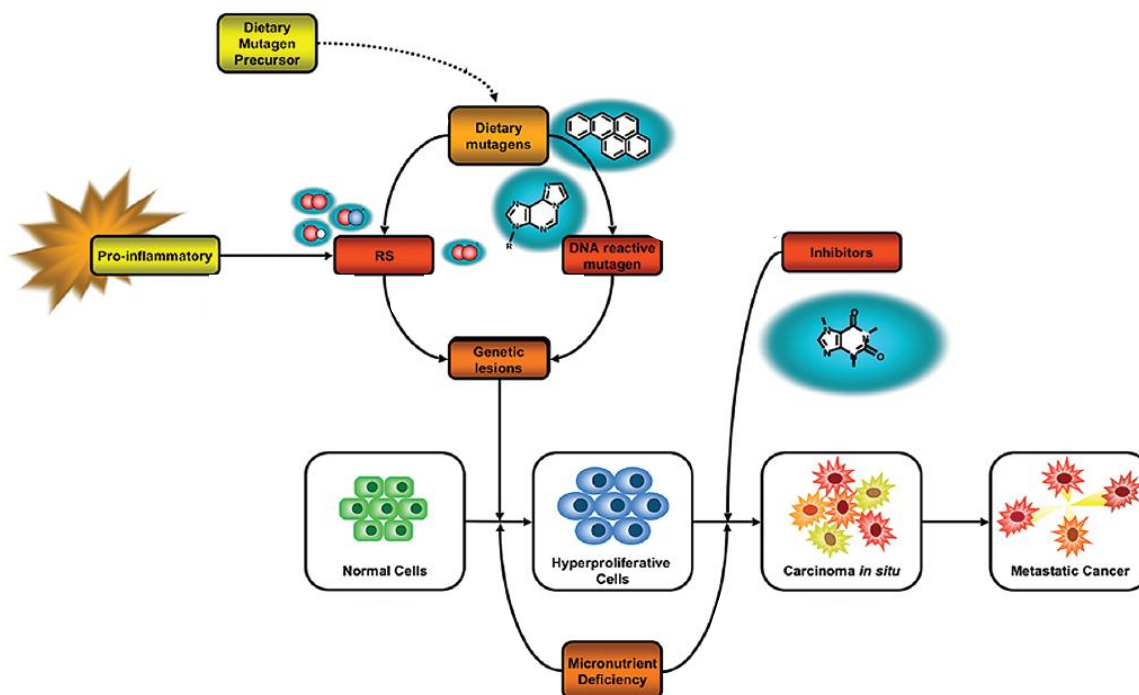
Os compostos químicos de natureza acentuadamente lipofílica têm facilidade em ser absorvidos através das membranas biológicas, ao mesmo tempo que os organismos têm dificuldade em os eliminar, visto os meios de excreção serem maioritariamente de natureza aquosa. Consequentemente, para que se não verifique uma acumulação tóxica destes compostos no organismo, torna-se necessário efetuar a sua biotransformação, ou seja, a sua conversão a compostos mais hidrofílicos e, portanto, mais facilmente excretáveis. O processo de biotransformação de xenobióticos consiste, assim, numa via de destoxificação, uma vez que permite ao organismo excretar compostos potencialmente tóxicos que, de outra forma, nele se acumulariam. Contudo, por vezes, verifica-se que os produtos resultantes das reações de biotransformação são altamente reativos face ao DNA, podendo, deste modo, causar lesões a esta biomolécula (Duarte, 2008).

É na sequência das bases azotadas que constituem a molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) que é guardada toda a informação genética das células. Esta informação é essencial para a síntese de todas as proteínas necessárias para os processos celulares. A estrutura complexa do DNA pode sofrer alterações por ação de substâncias químicas, endógenas, como, por exemplo, as ROS, ou

exógenas, como, por exemplo, os mutagêneos alimentares, de radiações eletromagnéticas ou de vírus (Wogan *et al.*, 2004; Hasty, 2005). Essas alterações no DNA podem originar o aparecimento de mutações, que resultem na alteração, quer da estrutura das proteínas, quer dos seus níveis de expressão.

Conforme os genes em que ocorrem, as mutações podem dar origem a alterações de função ou de estrutura celular ou podem não ter qualquer efeito sobre as células. Em particular, quando ocorrerem em genes reguladores do processo de divisão celular ou responsáveis pela manutenção da integridade do DNA, as mutações podem levar ao aparecimento de tumores (Bishop, 1991). Como forma de se protegerem, face a estas lesões genéticas, os organismos vivos evoluíram no sentido de desenvolverem mecanismos enzimáticos que monitorizam o genoma e que reparam as diversas lesões tendo sido identificados, no Homem, mais de 130 produtos de genes de reparação de DNA (Wogan *et al.*, 2004). Os compostos que possam inibir ou interferir com a ação destes sistemas de reparação de DNA podem, também, contribuir para o aparecimento de tumores (figura 2.4). A acumulação de lesões do DNA ao longo da vida, devido a falhas na sua reparação, parece estar relacionada com o desenvolvimento de diversas doenças, algumas delas ligadas ao envelhecimento.

O aparecimento de tumores é um processo complexo, parecendo desenvolver-se por etapas e envolvendo múltiplas alterações genéticas onde se incluem as mutações. Os ensaios de mutagenicidade permitem a identificação de agentes potencialmente cancerígenos devido à correlação que existe entre os processos de mutagénese e cancerigénese. No entanto, deve levar-se em conta que nem todos os cancerígenos têm efeito mutagénico. Existem alguns compostos que afetam significativamente o funcionamento celular induzindo o aparecimento de neoplasias, por processos diferentes da mutagénese como é o caso da ligação a recetores celulares específicos (Schecter *et al.*, 2006) ou da indução de alterações hormonais (Soto & Sonnenschein, 2010).



**Figura 2.4:** Papel dos mutagêneos alimentares na carcinogênese. Os mutagêneos alimentares, ou os seus metabolitos genotóxicos, podem reagir diretamente com o DNA; podem gerar o aparecimento de espécies reativas de oxigênio (RS) e, desta forma, causar indiretamente lesões no DNA, podem desencadear processos inflamatórios que levam ao aparecimentos de espécies reativas de oxigênio capazes de lesar o DNA; ou podem ser inibidores de enzimas importantes como é o caso das enzimas de reparação de DNA, contribuindo para o aumento da frequência de mutação, ou de outras enzimas importantes na regulação do ciclo celular, contribuindo assim para a progressão da cancerigênese. Também algumas deficiências em micronutrientes específicos, como o folato ou o selênio, podem comprometer os mecanismos de defesa capazes de prevenir as lesões no DNA e a promoção da cancerigênese (adaptado de Ferguson & Philpott, 2008).

### 2.4.1 Mutagêneos alimentares

Alguns constituintes alimentares naturais como o safrole, estragole e metileugenol, presentes em especiarias, têm demonstrado atividade mutagénica/carcinogénica (Ames, 1983) assim como os alcalóides de pirrolizidina que, por estarem presentes nas plantas, podem contaminar alimentos como a carne, o leite ou chás (Ames, 1983; Asres *et al.*, 2004; Ji *et al.*, 2008).

Os alimentos podem ainda conter contaminantes naturais ou antropogénicos como a aflotoxina B<sub>1</sub> ou hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs), respetivamente, que são capazes de gerar *in vivo* metabolitos com atividade mutagénica/carcinogénica (Ames, 1983; Goldman & Shields, 2003).

Os HPAs são compostos orgânicos com atividade genotóxica e/ou cancerígena resultantes da combustão incompleta de matéria orgânica (Pufulete *et al.*, 2004), queima de carvão, fumo de cigarro



além de vários processos industriais como, por exemplo, a produção de alumínio e a gaseificação do coque entre outros (Neto *et al.*, 2000). Os HPAs podem aparecer nos alimentos devido a contaminarem as zonas em que estes são produzidos ou podem formar-se nos próprios alimentos durante o seu processamento, principalmente através de processos de conservação que utilizam a fumagem ou ainda em carne ou peixe preparados a temperaturas elevadas (Tabela 2.3) (Goldman & Shields, 2003).

**Tabela 2.3:** Níveis de HPAs encontrados em amostras ambientais, biológicas e em alimentos (Neto *et al.*, 2000).

Tipo de amostra	Concentração
Ar	1,3 a 500 ng/m <sup>3</sup>
Solo	0,8 ng/kg a 100 mg/kg
Água	2,5 a 500 ng/dm <sup>3</sup>
Plantas	< 150 µg/kg
Alimentos	0,1 a 20 µg/kg

A confeção de carne de vertebrados a temperaturas elevadas pode provocar a pirólise de aminoácidos ou a reação entre os aminoácidos e açúcares na presença de creatina e, em ambos os casos, levar à formação de aminas aromáticas heterocíclicas com propriedades mutagénicas e possivelmente cancerígenas (Goldman & Shields, 2003).

As *N*-nitrosaminas são outra classe de compostos mutagénicos e possivelmente carcinogénicos a que o ser humano pode estar exposto através da alimentação (Dutra *et al.*, 2007). As *N*-nitrosaminas podem estar presentes em alimentos conservados por adição de nitrato e/ou nitrito como carnes curadas e queijos ou defumados como peixes e produtos cárneos. Neste último caso, a reação entre o óxido de azoto (presente no fumo) com o oxigénio atmosférico origina tetróxido de azoto (N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) que reage como agente nitrosante (Dutra *et al.*, 2007). As *N*-nitrosaminas também podem ter origem endógena formando-se no estômago, a partir de precursores, como o ião nitrito e os aminoácidos, presentes nos alimentos. A partir de ensaios realizados em animais de laboratório foi possível associar a exposição a *N*-nitrosaminas com o desenvolvimento de diversos tipos de tumores, nomeadamente, do fígado, rins, glândula mamária, estômago, pâncreas, bexiga e esófago (Goldman & Shields, 2003; Drabik-Markiewicz *et al.*, 2009).

Durante o processamento de produtos alimentares, a aplicação de temperaturas elevadas (90 °C a 220 °C) também pode levar a que ocorram reações de Maillard cujos produtos finais podem, em alguns casos, apresentar, igualmente, atividade mutagénica e/ou cancerígena. Exemplo desta situação

é a formação da acrilamida que pode aparecer em produtos com elevado teor em glúcidos processados a temperaturas elevadas. A acrilamida foi classificada como provavelmente cancerígena para o Homem pela Agência Internacional de Pesquisa do Cancro (IARC-International Agency for Research on Cancer) em 1994. No corpo humano, a acrilamida, pode ser metabolizada a glicidamina, composto considerado indutor de cancro, ou formar adutos com proteínas, tais como, a hemoglobina (Clayes *et al.*, 2005).

Algumas mutações podem estar relacionadas com a deficiência alimentar em alguns micronutrientes, como, por exemplo, o folato e o selénio (Ferguson & Philpott, 2008).

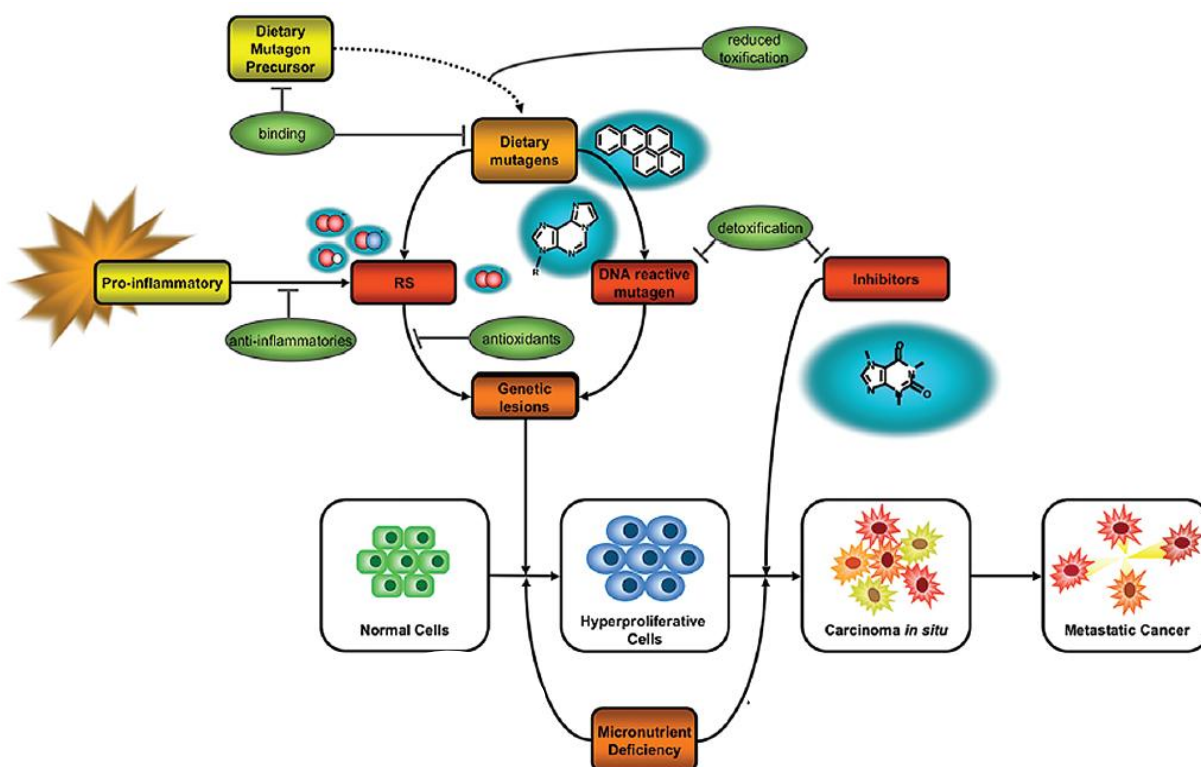
## **2.4.2 Antimutagêneos alimentares**

A dieta humana, para além de poder constituir uma fonte de compostos mutagénicos e potencialmente cancerígenos, pode, igualmente, constituir uma fonte de compostos com atividade antimutagénica que, através de diferentes mecanismos, conseguem anular a ação dos genotóxicos, contribuindo, desta forma, para diminuir o risco de neoplasias.

Um grande número de estudos *in vitro* e *in vivo* tem permitido a identificação de vários compostos com atividade antimutagénica, tanto em alimentos naturais, como em suplementos alimentares (Ferguson & Philpott, 2008). Estes antimutagêneos alimentares podem exercer a sua atividade através de diversos mecanismos. A ligação direta ao mutagénico impedindo que este seja absorvido ou que possa atingir o seu alvo celular constitui um destes mecanismos. Por exemplo, a clorofila e derivados parecem ter efeito antimutagénico direto ligando-se a compostos eletrofílicos criando complexos insolúveis que são excretados antes do mutagénico poder atuar no material celular (Ferguson & Philpott, 2008). Também as fibras alimentares podem adsorver compostos mutagénicos, como as aminas heterocíclicas, impedindo a sua absorção (Ferguson, 2001). Para além disso, estas fibras, ao acelerarem o trânsito intestinal, reduzem o tempo de permanência dos compostos mutagénicos no intestino e, desta forma, não só reduzem a probabilidade destes serem absorvidos, como também reduzem o tempo de exposição da mucosa intestinal a este tipo de compostos (Ferguson *et al.*, 2004).

Outro dos possíveis mecanismos pelo qual os compostos podem exercer a sua atividade antimutagénica é pela inibição da formação endógena de mutagêneos. Por exemplo o ácido ascórbico, assim como diversos polifenóis, são inibidores das reações de nitrosação. Os compostos organossulfurados, presentes nos alhos e cebolas, os isotiocianatos, presentes nas crucíferas, e diversos polifenóis parecem alterar o metabolismo dos cancerígenos inibindo as enzimas envolvidas na sua bioativação e induzindo as enzimas envolvidas na sua destoxificação (Ferguson, 2001).

A atividade antimutagénica pode, igualmente, resultar da desativação de ROS, realizada pelos antioxidantes, entre os quais se encontram os compostos fenólicos, ou da inibição da sua formação que ocorre na presença de compostos com atividade anti-inflamatória ou inibidores das enzimas oxidativas. Também os compostos químicos, ou os micronutrientes, capazes de estimular os processos de reparação de DNA ou de modular a expressão ou a atividade de enzimas importantes na regulação do ciclo celular, podem exercer, por essas vias, atividade anticancerígena (Figura 2.5) (Ferguson & Philpott, 2008).



**Figura 2.5:** Papel dos antimutagênicos/anticancerígenos alimentares na prevenção da cancerigênese. Os antimutagênicos/anticancerígenos alimentares podem ligar-se aos mutagênicos, ou aos seus precursores, impedindo a sua absorção ou a sua ação; podem modificar a sua biotransformação bloqueando o aparecimento de metabolitos genotóxicos, ou estimular a sua rápida inativação impedindo, desta forma, o aparecimento de lesões no DNA. Estes compostos podem ainda, inibir os processos inflamatórios, desativar as espécies reativas de oxigênio, desativar os inibidores ou estimular a atividade de enzimas de reparação de DNA ou de outras enzimas importantes na regulação do ciclo celular, contribuindo assim para a diminuição da taxa de mutações no DNA e dificultando a progressão da cancerigênese (Ferguson & Philpott, 2008).

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Caracterização das amostras de mirtilo

Na realização deste trabalho foram analisadas as variedades de mirtilo O'Neal e Earliblue gentilmente cedidas por dois fornecedores diferentes: Mirtilusa em Sever do Vouga (ambas as variedades) e Mirtisul sediada em Aldeia do Pico, Grândola (apenas a variedade O'Neal).

As variedades fornecidas pela Mirtilusa foram colhidas em duas alturas diferentes. Na primeira recolha ambas as variedades se encontravam num estado de maturação precoce, enquanto na segunda recolha (7 dias depois) o estado de maturação das bagas era aquele em que estas, normalmente, são comercializadas, ou seja na plena maturação quando os frutos se apresentam com a totalidade da coloração desenvolvida mas sem perda de turgescência. Os mirtilos recolhidos na Mirtisul correspondem a frutos produzidos em condições de “cultura biológica” e foram colhidos na plena maturação.

As variedades foram sempre colhidas de manhã tendo cada amostra sido composta por aproximadamente 300 g de cada cultivar, de entre três a seis plantas de cada genótipo. Depois de colhidas, as amostras foram transportadas em saco térmico até à Faculdade de Ciências e Tecnologia (*Campus* da Caparica) no escuro, sob refrigeração, tendo sido preparadas para análise (realização dos extratos) num prazo máximo de duas horas.

#### 3.2 Reagentes e meios de cultura

Na realização do presente trabalho foram utilizados os seguintes reagentes e meios de cultura: acetato de amónio (Riedel-de Haën, 98%); acetato de sódio tri-hidratado (Panreac, 99%); ácido L (+) ascórbico (Panreac, 99%); ácido cítrico mono-hidratado (JMGS, 99,8%); ácido clorídrico (Panreac, 37%); ácido gálico (Merck, 99,5%); 2,2'-azobis(2-metilpropionamida)di-hidrocloreto (AAPH) (Sigma-Aldrich, 97%); azul de nitrotetrazólio (NBT<sup>2+</sup>) (Sigma); Bacto agar (Becton Dickinson and Company); biotina (Sigma-Aldrich, 99%); carbonato de sódio (VReis); cloreto de cobre (II) bi-hidratado (Riedel-de Haën, 99%); cloreto de ferro (III) hexa-hidratado (Merck, 99%); cloreto de potássio (Panreac, 99%); cloreto de sódio (Panreac, 99,5%); di-hidrogenofosfato de sódio (Panreac, 98%); dinucleótido de nicotinamida e adenina na forma reduzida (NADH) (Sigma, 97%); etanol (Riedel-de Haën, 99%); fluoresceína (Sigma-Aldrich); D-glucose monohidratada (Panreac); hidrogenofosfato de dipotássio (Becton Dickinson and Company, 97,5%); hidróxido de sódio (Merck,

99%); histidina (Merck, 99%); meio de cultura Nutrien Broth (NB) nº2 (Oxoid); metanol (Riedel-de Haën, 99,8%); metossulfato de fenazina (PMS) (Sigma, 90%); neocuproína (2,9-dimetil-1,10-fenantrolina) (Sigma); peróxido de hidrogénio (Panreac, 30%); reagente de Folin-Ciocalteu (Panreac); sal dissódico de ácido etilenodiaminatetracético (EDTA) (Panreac, 99%); sal dissódico de ácido 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina-4',4''-dissulfónico (ferrozina) (Sigma-Aldrich); sulfato de magnésio heptahidratado (Merck, 99,5%); sulfato ferroso hepta-hidratado (Riedel-de Haën, 99%); *tert*-butil hidroperóxido (t-BHP) (Sigma-Aldrich, 70% em H<sub>2</sub>O); 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) (Fluka, 99%); hidrogenofosfato de amónio e sódio tetrahidratado (NaNH<sub>4</sub>HPO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O) (Sigma, 99%) e trolox (Acros Organics, 97%). Na preparação de todas as soluções, diluições e meios de cultura, utilizou-se água ultrapura, captada a partir de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Molsheim, França).

### 3.3. Preparação dos extratos de mirtilo

De acordo com Smith e colaboradores (2000), a melhor estratégia de armazenamento dos extratos é mantê-los no escuro a baixas temperaturas, separados em alíquotas, de forma a retirar apenas a quantidade necessária a cada ensaio. Assim, em todos os passos realizados até à obtenção dos extratos, separação em alíquotas e realização dos ensaios, foi minimizado o contacto com a luz, oxigénio e temperaturas elevadas.

Os extratos foram preparados de acordo com o procedimento descrito por Connor e colaboradores (2002), com pequenas adaptações. Assim, aos mirtilos previamente triturados foi adicionado metanol acidificado com ácido clorídrico (0,1% volume/volume) e arrefecido em gelo, numa proporção de 10 g de fruto por cada 20 mL de solvente. A mistura foi agitada em gelo durante 20 minutos e filtrada, por gravidade, através de um filtro de papel (Watman – Lote EW0287-1; Ref. Nº 10311612). Repetiu-se a extração, a partir dos resíduos recuperados do papel de filtro, usando igual volume de metanol acidificado, nas mesmas condições. O filtrado total recuperado foi diluído a 50 mL, num balão volumétrico, com o solvente da extração. Os extratos assim obtidos foram evaporados em rotavapor (Büchi R-200) e um banho termoestatizado a 37 °C (Büchi heating bath B-490) até à evaporação total do metanol. Os extratos secos foram ressuspensos em 50 mL de água ultrapura, em balão volumétrico, ficando com uma concentração final de 0,20 g/mL. Os extratos foram filtrados em ambiente asséptico (câmara de fluxo laminar) através de membranas estéreis Millipore Millex GP com poro de 0,22 µm. Depois de esterilizados, os extratos foram distribuídos em alíquotas de 1,5 mL em tubos de polipropileno estéreis e congelados a -50 °C (UltraCongelador New Brunswick Scientific U410).

### 3.4 Determinação dos fenóis totais pelo Método de Folin-Ciocalteu

O ensaio Folin-Ciocalteu baseia-se na redução a pH alcalino do heteropolianião molibdotungsteniofosfórico do reagente de Folin-Ciocalteu, efetuada pelos compostos fenólicos, na forma de ião fenolato, da amostra e que origina o aparecimento de um produto azul com um máximo de absorção a 765 nm, sendo a intensidade da coloração desenvolvida proporcional ao teor em compostos fenólicos (Singleton *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2005). Este método é simples, sensível e preciso mas que pode sofrer interferências de outros componentes da amostra que possam igualmente reagir com o reagente de Folin-Ciocalteu como, por exemplo, adenina, adenosina, alanina, ácido aminobenzóico, ácido ascórbico, benzaldeído, cisteína, creatinina, histamina, histidina, índole, frutose, sacarose, sulfito de sódio, sulfato de ferro e outros (Prior *et al.*, 2005).

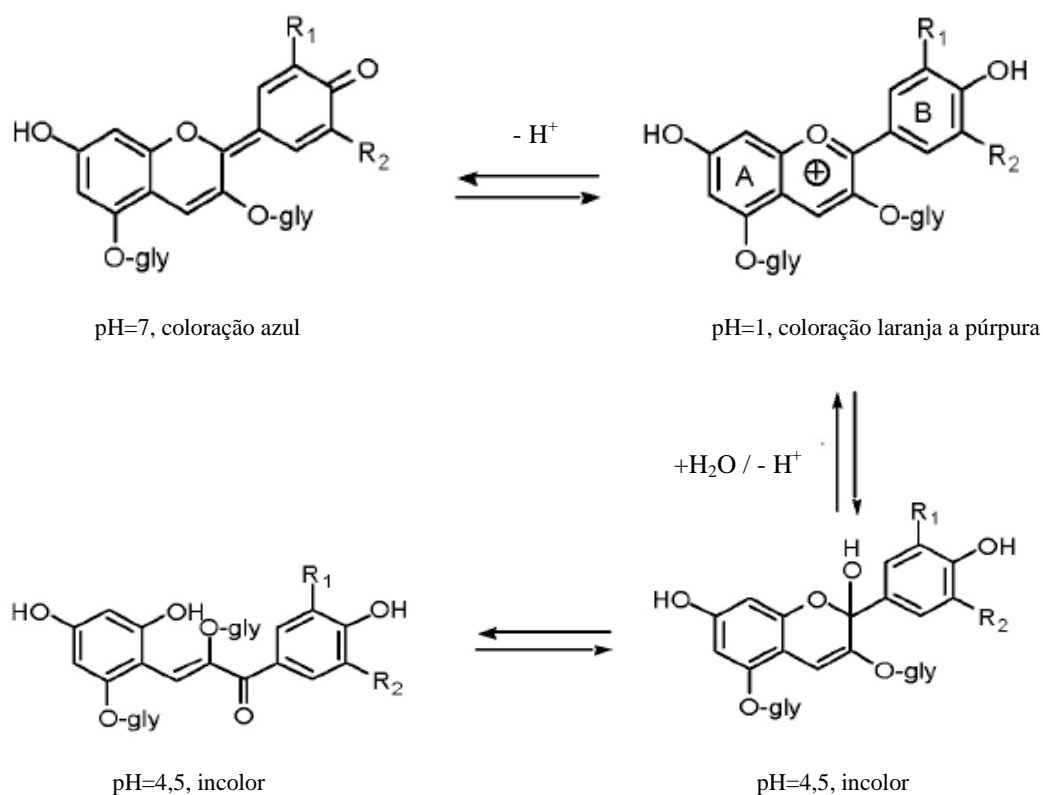
Para a determinação dos compostos fenólicos totais utilizou-se o método descrito por Kosar e colaboradores (2008) com algumas modificações. Assim, em balões volumétricos de 10 mL, contendo cerca de 6 mL de água ultrapura, adicionou-se 100 µL de cada amostra de mirtilo e 500 µL de reagente de Folin-Ciocalteu sem diluição. Deixou-se um minuto à temperatura ambiente, adicionou-se 1,5 mL de uma solução de carbonato de sódio a 20% (peso/volume) e fez-se o volume a 10 mL com água ultrapura. As misturas assim preparadas foram incubadas durante 2 horas, a 25 °C e no escuro. Findo este tempo, procedeu-se então à medição da absorvância das amostras num espectrofotómetro (SPEKOL 1500) a 765 nm, contra um branco preparado da mesma forma mas substituindo a amostra por água ultrapura.

Todas as amostras foram analisadas em quadruplicado, tendo a concentração em fenóis sido determinada por interpolação de uma reta de calibração, preparada da forma já descrita mas substituindo as amostras por soluções de ácido gálico com concentrações entre os 50 e os 500 mg/L.

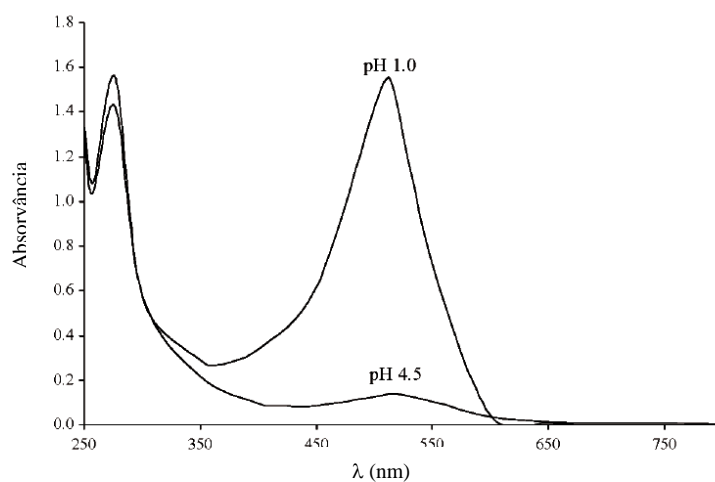
Os resultados obtidos foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por 100 grama de peso fresco de amostra (por 100 grama de fruto).

### 3.5 Quantificação das antocianinas monoméricas totais pelo método do pH diferencial

Este método baseia-se na transformação estrutural reversível em função do pH que as antocianinas monoméricas sofrem (Figura 3.1) que leva à obtenção de diferentes espectros de absorção (Figura 3.2). Assim, a pH 1, a forma predominante é a de oxónio colorido ( $\lambda_{\text{max-vis}}$  520 nm) enquanto a pH 4,5 a forma predominante é a de hemiacetal sem coloração (sem absorção a 520 nm).



**Figura 3.1:** Formas estruturais predominantes de antocianinas presentes a diferentes valores de pH (Lee *et al.*, 2005).



**Figura 3.2:** Características espectrais das antocianinas em soluções a pH 1,0 e a pH 4,5 (Lee *et al.*, 2005).

O método do pH diferencial permite medir, com rapidez e precisão, o total de antocianinas, mesmo quando em presença de pigmentos polimerizados e de outros compostos interferentes, uma vez

que estes não sofrem a mesma alteração de absorção em função do pH. A diferença de absorção a 520 nm de um extrato a pH 1 e a pH 4,5 é então proporcional à quantidade de antocianinas totais.

A determinação das antocianinas totais foi efetuada de acordo com o método descrito por Lee e colaboradores (2005). Assim, os extratos foram diluídos numa solução de cloreto de potássio 0,025M, acidificada com ácido clorídrico até pH 1, até que a absorvância a 520 nm das soluções ficasse dentro da zona linear do espectrofotómetro (SPEKOL 1500) (entre 0,2 e 1), para que não fosse excedida a capacidade tampão dos reagentes, a percentagem de amostra na solução final nunca foi superior a 20%. Procedeu-se à mesma diluição dos extratos utilizando uma solução tampão de acetato de sódio 0,4 M a pH 4,5. Deixaram-se estabilizar as soluções durante 20 minutos e leu-se a absorvância no referido espectrofotómetro a 520 nm e a 700 nm, utilizando água ultrapura como branco. A leitura a 700 nm foi feita com o objetivo de eliminar possíveis interferências de alguns materiais uma vez que a este comprimento de onda as antocianinas não absorvem.

As amostras foram analisadas em quadruplicado tendo o teor em antocianinas no extrato, expresso em mg equivalentes de cianidina-3-glucósido, sido determinado recorrendo à seguinte expressão:

$$\text{mg equivalentes/L} = (A \times MM \times FD \times 10^3) / \epsilon \times d$$

Sendo que: A corresponde a  $[(A_{520}-A_{700})_{\text{pH1}}-(A_{520}-A_{700})_{\text{pH4,5}}]$ ; MM é a massa molar da cianidina-3-glucósido (449,2 g/mol); FD é o fator de diluição determinado;  $10^3$  o fator de conversão de g para mg; d o percurso ótico (1 cm) e  $\epsilon$  o coeficiente de absorvidade molar da cianidina-3-glucósido ( $26900 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (Lee *et al.*, 2005).

Os resultados finais foram expressos em mg de equivalentes de cianidina-3-glucósido por 100 gramas de peso fresco de amostra.

### 3.6. Determinação do teor de sólidos solúveis (grau Brix)

O grau Brix indica a percentagem de sólidos solúveis no sumo do fruto. Este parâmetro pode ser influenciado por vários fatores nos quais se incluem, a variedade, região de cultivo, fatores climáticos e estado de maturação (Türkmen & Eksi, 2011). Cada grau Brix corresponde a 1g de sólidos solúveis/açúcares por 100 g de sumo. A determinação do grau Brix é usada como referência de ponto de colheita e consumo para a maioria das frutas, especialmente para as não-climatéricas.

O sumo extraído de 5 bagas de cada cultivar foi utilizado para determinar a concentração de sólidos solúveis, através de um refratómetro manual, com correção de temperatura, Modelo EUROMEX – 5532 (0-32%), sendo o resultado expresso em percentagem (grau Brix).



## 3.7. Avaliação da Capacidade Antioxidante

### 3.7.1. Determinação da capacidade de quelação de Fe(II)

A ferrozina (3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina-4',4''-sal dissulfônico de sódio) pode formar complexos de cor vermelha com os íons  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $[\text{Fe}(\text{Ferrozina})_3]^{4-}$ , apresentando estes complexos um máximo de absorção a 562 nm. Na presença de agentes quelantes, a formação desses complexos é dificultada, resultando numa diminuição da coloração vermelha característica. As medições da diminuição da coloração, através da medição da diminuição da intensidade da absorção a 562 nm, permitem efetuar uma estimativa da capacidade de quelação do ferro da amostra (Geckil *et al.*, 2005).

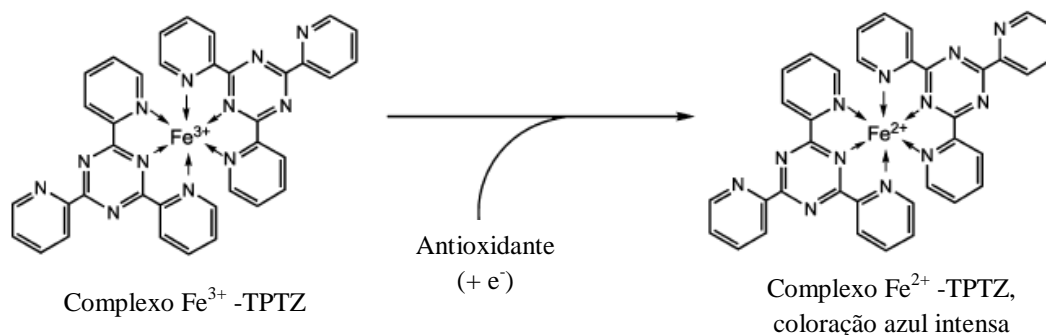
A capacidade de quelação de ferro foi avaliada de acordo com a técnica descrita por Geckil e colaboradores (2005). Assim, as misturas reacionais foram preparadas misturando diferentes volumes de amostra, ou de suas diluições, com 50  $\mu\text{L}$  de uma solução  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,2 mM). Após uma incubação de cinco minutos à temperatura ambiente adicionaram-se 200  $\mu\text{L}$  de ferrozina (5 mM), ajustou-se o volume a 2000  $\mu\text{L}$  com água, agitou-se vigorosamente a mistura obtida e incubou-se durante 10 minutos, também à temperatura ambiente. Terminada esta segunda incubação, leu-se a absorvância a 562 nm no espectrofotômetro (SPEKOL 1500). Realizaram-se igualmente um controlo negativo, substituindo a amostra por igual volume de água ultrapura (solvente da amostra), e um controlo de interferência da cor da amostra, utilizando igual volume de amostra e completando a 2000  $\mu\text{L}$  com água ultrapura.

As amostras foram analisadas em quadruplicado tendo a percentagem de inibição da formação dos complexos  $[\text{Fe}(\text{Ferrozina})_3]^{4-}$  sido calculada através da seguinte expressão:

$$\% \text{Inibição} = [(\text{Abs}_{\text{controlo negativo}}) - (\text{Abs}_{\text{amostra com ferrozina}} - \text{Abs}_{\text{amostra sem ferrozina}}) / (\text{Abs}_{\text{controlo negativo}})] \times 100$$

### 3.7.2 Determinação da atividade de redução Fe(III) a Fe(II) pelo ensaio FRAP (“Ferric Reduction Antioxidant Power”)

O ensaio FRAP baseia-se na determinação da capacidade da amostra para reduzir o Fe(III) a Fe(II), medindo assim a sua capacidade redutora. Quando o Fe(III) do complexo de Fe(III)-tripiriditriazina ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) é reduzido a Fe(II) forma-se, em meio ácido, uma intensa coloração azul suscetível de ser quantificada espectrofotometricamente a 593 nm e que é proporcional à quantidade de espécies redutoras (mecanismo antioxidante SET) presentes na amostra (Figura 3.3) (Benzie & Strain, 1996).



**Figura 3.3:** Formação do complexo ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ) após redução do  $\text{Fe}^{3+}$  por um antioxidante (Moon & Shibamoto, 2009).

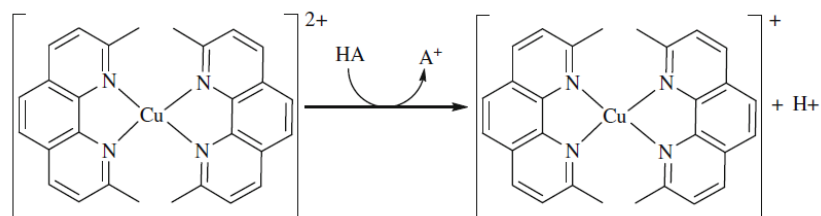
Para a realização do ensaio FRAP seguiu-se o método descrito por Ramful e colaboradores (2010) com algumas modificações. O reagente FRAP preparou-se no momento da utilização, adicionando 25 mL de tampão acetato 0,25 M (pH 3,6), 2,5 mL de TPTZ (10 mM) em HCl (40 mM) e 2,5 mL de cloreto de ferro (III) ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 20 mM). O ensaio iniciou-se com a adição, num tubo de ensaio, de 3,0 mL do reagente FRAP, preparado de fresco e pré-aquecido a 37 °C, com 300  $\mu\text{L}$  de água e 100  $\mu\text{L}$  de cada um dos extratos. As misturas foram incubadas no escuro durante 4 minutos a 37 °C. Durante esta incubação foi possível observar o aparecimento de uma coloração azul, cuja intensidade variava entre as várias amostras, e que foi quantificada por leitura da absorvância a 593 nm num espectrofotômetro (SPEKOL 1500) utilizando como branco a absorvância do reagente FRAP.

A diferença entre a absorvância da amostra e a absorvância do branco foi determinada e usada para calcular o valor de FRAP. As amostras foram analisadas em quadruplicado, tendo a atividade antioxidante sido determinada por interpolação de uma reta de calibração, preparada da forma já descrita para as amostras, mas substituindo as amostras por soluções de sulfato ferroso com concentrações entre os 0 e os 1,25 mM. Os resultados foram expressos em mmol de  $\text{Fe}^{2+}$ /por 100 grama de peso fresco de mirtilo.

### 3.7.3. Determinação da redução do Cu(II) pelo ensaio CUPRAC (“Cupric Reducing Antioxidant Capacity”)

O ensaio CUPRAC consiste na redução do Cu(II) para Cu(I) por ação de redutores (antioxidantes) presentes numa amostra. Ao contrário da forma oxidada (Cu(II)-neocuproína), a forma

reduzida do complexo Cu-neocuproína (Cu(I)-neocuproína) apresenta uma coloração intensa com um máximo de absorção a 450 nm (Figura 3.4). Assim, a redução da forma oxidada deste complexo (Cu(II)-neocuproína) pelos compostos da amostra pode ser determinada espectrofotometricamente através da leitura da absorvância a 450 nm (Apak *et al.*, 2004).



**Figura 3.4:** Redução do complexo Cu(II)–neocuproína a Cu(I)–neocuproína, por ação de uma molécula antioxidante (HA) originando uma molécula de antioxidante oxidada ( $A^+$ ). Os prótons libertados na reação são neutralizados numa solução tampão de acetato de amónio (Gülçin, 2012).

A realização do ensaio CUPRAC foi efetuada de acordo com o método descrito por Apak e colaboradores (2004) com algumas adaptações. Assim, num tubo de ensaio juntou-se 1 mL de cada uma das seguintes soluções: cloreto de cobre (II) bihidratado 10 mM, acetato de amónio 1M, neocuproína 7,5 mM em etanol. Em seguida, adicionou-se 50  $\mu$ L de amostra e completou-se a 4100  $\mu$ L com água. Os tubos foram incubados ao abrigo da luz durante 1 hora à temperatura ambiente procedendo-se então à leitura da absorvância (espectrofotómetro SPEKOL 1500) a 450 nm, utilizando como branco a mesma mistura com 1,1 mL de água ultrapura em vez da amostra. As amostras foram analisadas em quadruplicado tendo a atividade antioxidante sido determinada por interpolação de uma reta de calibração, preparada da forma já descrita mas substituindo as amostras por 1,1 mL das soluções padrão de ácido ascórbico (15,625; 31,25; 62,5; 125; e 250  $\mu$ M). Os resultados foram expressos em mmol equivalentes de ácido ascórbico por 100 grama de peso fresco de mirtilo.

Em relação aos ensaios de redução do ferro, o CUPRAC tem a vantagem de conseguir detetar antioxidantes do tipo tiol (glutathiona, cisteína, etc.). Por outro lado o facto do potencial redox para o par Cu(II)- neocuproína /Cu(I)- neocuproína ser inferior ao do Fe(III)/Fe(II) com os respetivos ligandos do FRAP faz com que determinados compostos, tais como açúcares simples ou o ácido cítrico não possam ser reduzidos no CUPRAC podendo-o ser no FRAP. O método é rápido e não necessita de aparelhos muito sofisticados, sendo a reação relativamente insensível ao ar, luz, humidade ou pH (Apak *et al.*, 2004).

### 3.7.4. Determinação do sequestro do peróxido de hidrogénio

O peróxido de hidrogénio apresenta um máximo de absorção a 230 nm. Desta forma, a percentagem de sequestro deste composto pode ser determinada pela diminuição da absorvância a 230 nm de uma solução de peróxido de hidrogénio na presença de amostra, por comparação com um branco (Magalhães *et al.*, 2008; Esmaeili & Sonboli, 2010).

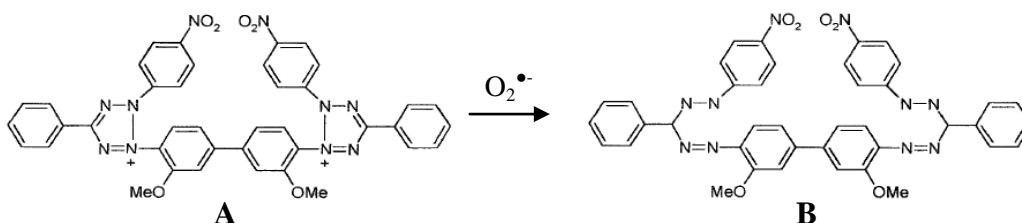
A percentagem de sequestro do peróxido de hidrogénio foi determinada de acordo com o procedimento descrito por Esmaeili & Sonboli (2010). Assim, em tubos de ensaio, misturaram-se 400 µL de extrato e 4,6 mL de solução 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> preparada em tampão fosfato (50 mM, pH 7,4). A mistura foi incubada, no escuro, durante 30 minutos, a 25 °C. Findo o período de incubação, leu-se a absorvância das soluções num espectrofotómetro (SPEKOL 1500) a 230 nm, utilizando cuvetes de quartzo. Para cada uma das amostras foi preparado um branco com o mesmo volume de cada um dos extratos e 4,6 mL de tampão fosfato (50 mM, pH 7,4), sem peróxido de hidrogénio. Foi ainda preparado um controlo para o ensaio, com 400 µL de água ultrapura e 4,6 mL da solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tampão fosfato (50 mM, pH 7,4). As amostras foram analisadas em quadruplicado tendo a percentagem de sequestro de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sido calculada utilizando a seguinte expressão:

$$\% \text{ sequestro} = [(Abs_{\text{controlo}} - (Abs_{\text{amostra}} - Abs_{\text{branco da amostra}}))/(Abs_{\text{controlo}})] \times 100$$

O peróxido de hidrogénio forma-se *in vivo*, no decurso de diversos processos metabólicos, nomeadamente pela ação de diversas enzimas como a glucose oxidase ou a superóxido dismutase. Desta forma uma das vantagens deste ensaio é a de se estudar a capacidade de sequestro de um oxidante com relevância fisiológica.

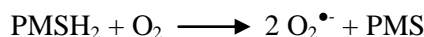
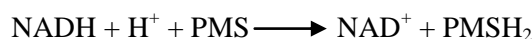
### 3.7.5. Determinação do sequestro do radical anião superóxido

O azul de nitrotetrazólio (NBT<sup>2+</sup>) reage com o radical anião superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) dando origem ao azul de formazano (Figura 3.5) que possui um máximo de absorção a 560 nm. Desta forma, se à mistura de reação se adicionar um composto com capacidade para captar o O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, passarão a existir, no meio reacional, dois compostos a competir pelo radical anião superóxido, o que se traduz por uma diminuição da extensão da redução do NBT<sup>2+</sup>, com uma consequente diminuição da taxa de aumento da absorvância a 560 nm (Valentão *et al.*, 2001; Magalhães *et al.*, 2008).



**Figura 3.5** - Redução do  $\text{NBT}^{2+}$  (A) pelo radical anião superóxido, dando origem ao azul de formazano (B).

Neste ensaio o radical anião superóxido é gerado utilizando o sistema metossulfato de fenazina (PMS)/NADH em condições aeróbias (figura 3.6) (Nakamura *et al.*, 1992).



**Figura 3.6:** Formação do radical anião superóxido através do sistema PMS/NADH (Nakamura *et al.*, 1992).

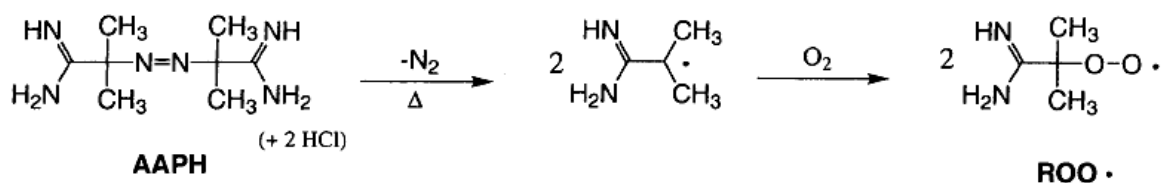
A capacidade das amostras para sequestrar o radical anião superóxido foi avaliada de acordo com o método descrito por Valentão e colaboradores (2001) com pequenas alterações. Assim, em cuvetes do espectrofotômetro adicionaram-se 200  $\mu\text{L}$  de cada uma das amostras. Em seguida adicionaram-se 300  $\mu\text{L}$  de NADH 1,66 mM em tampão fosfato (19 mM, pH 7,4), 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{NBT}^{2+}$  430  $\mu\text{M}$  em tampão fosfato (19 mM, pH 7,4) e por fim tampão fosfato (19 mM, pH 7,4) para completar a 2 950  $\mu\text{L}$ . A reação iniciou-se com a adição de 50  $\mu\text{L}$  de PMS 162  $\mu\text{M}$  em tampão fosfato (19 mM, pH 7,4) tendo-se acompanhado a variação da absorvância a 560 nm, durante dois minutos à temperatura ambiente. A estabilidade do  $\text{NBT}^{2+}$  em presença das amostras foi verificada, através da observação da estabilidade da absorvância a 560 nm antes da adição do PMS, como forma de garantir que as amostras em si não tinham capacidade de reduzir o  $\text{NBT}^{2+}$  a formazano. Realizou-se, igualmente, um ensaio controlo substituindo a amostra por igual volume de solvente da amostra (água). As determinações foram realizadas em quadruplicado, no espectrofotômetro (SPEKOL 1500). A percentagem de inibição da redução do  $\text{NBT}^{2+}$  de cada uma das amostras foi calculada em relação ao controlo utilizando a seguinte expressão:

$$\% \text{ Inibição} = [(\text{Variação}_{\text{absorvância do controlo}} - \text{Variação}_{\text{absorvância da amostra}}) / (\text{Variação}_{\text{absorvância do controlo}}) \times 100]$$

O radical anião superóxido resulta da redução do oxigénio molecular e pode surgir no decurso de diversos processos metabólicos. Desta forma, uma das vantagens deste ensaio é a de se utilizar um oxidante com relevância fisiológica. Este ensaio pode dar resultados erróneos quando a amostra interfere com o sistema gerador do radical anião superóxido ou quando a amostra reduz diretamente o  $\text{NBT}^{2+}$ , embora esta última situação possa ser despistada pela observação da estabilidade da absorvância antes da adição do PMS.

### 3.7.6. Determinação do resgate do radical peroxilo pelo ensaio ORAC (“Oxygen Radical Absorbance Capacity”)

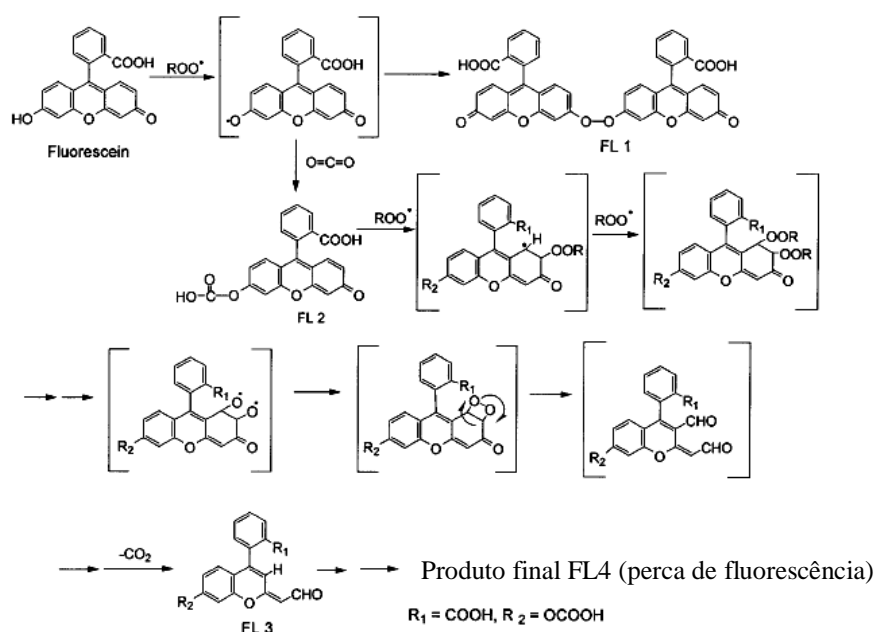
Este ensaio permite determinar a capacidade da amostra em estudo para sequestrar radicais peroxilo ( $\text{ROO}^\bullet$ ) gerados pela decomposição térmica (a  $37^\circ\text{C}$ ) do 2,2'-Azobis(2-metilpropionamidina) dihidroclorato (AAPH) (Figura 3.7), através da determinação da inibição da oxidação da fluoresceína induzida por estes radicais.



**Figura 3.7:** Esquema para a decomposição do AAPH originando radicais peroxilo. Da termodecomposição do AAPH resulta o radical  $\text{R}^\bullet$  que, ao reagir com  $\text{O}_2$ , dá origem ao radical  $\text{ROO}^\bullet$  (Dunlap *et al.*, 2003).

O radical peroxilo oxida a fluoresceína originando produtos não fluorescentes (Figura 3.8). Desta forma a incubação da fluoresceína na presença de uma fonte de radicais peroxilo leva a uma diminuição imediata da fluorescência. Quando esta incubação se processa na presença de um antioxidante verifica-se um período de latência antes de se iniciar essa diminuição, sendo que esse período de latência é tanto maior quanto maior for a capacidade antioxidante da amostra (Ou *et al.*, 2001).

A realização deste ensaio com diferentes concentrações de Trolox permite a construção de uma curva de calibração que relaciona a concentração deste antioxidante com a área sob a curva de decaimento da fluoresceína. Desta forma, sabendo o valor desta área em presença da amostra, é possível avaliar a capacidade de sequestro do radical peroxilo pela mesma, expressa em equivalentes de Trolox, por interpolação da respetiva reta de calibração (Ou *et al.*, 2001).



**Figura 3.8:** Mecanismos propostos para a oxidação da fluoresceína pelo radical peróxido (Ou *et al.*, 2001).

Para a realização do ensaio ORAC seguiu-se o método descrito por Ou e colaboradores (2001) com algumas modificações, tendo-se efetuado todas as determinações em triplicado. As misturas reacionais compostas por 20  $\mu\text{L}$  das diferentes amostras diluídas em tampão fosfatos (75 mM, pH 7,4), 20  $\mu\text{L}$  de diluições de trolox (entre 0,781 e 50  $\mu\text{M}$  em tampão fosfatos 75 mM, pH 7,4) ou, no caso do branco, 20  $\mu\text{L}$  de tampão fosfatos (75 mM, pH 7,4), e 160  $\mu\text{L}$  de fluoresceína (0,075  $\mu\text{M}$  em tampão fosfatos 75 mM, pH 7,4) foram preparadas em microplacas de 96 poços. Após as placas terem sido pré-incubadas durante cinco minutos a 37 °C, iniciou-se a reação com a adição a cada poço de 20  $\mu\text{L}$  de uma solução de AAPH (35,7 g/L em tampão fosfatos 75 mM, pH 7,4) pré-aquecida a 37 °C. As placas foram colocadas num leitor de microplacas (Anthos Zenyth 3100) e incubadas a 37 °C, com agitação durante 30 minutos, tendo a fluorescência ( $\lambda$  de excitação = 485 nm e  $\lambda$  de emissão = 535 nm) sido medida em intervalos de 1 minuto.

A área sob a curva (AUC) de decaimento da fluorescência da fluoresceína ao longo do tempo foi calculada recorrendo à seguinte expressão (Ou *et al.*, 2001):

$$\text{AUC} = 1 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + f_3/f_0 + \dots + f_{30}/f_0$$

Sendo  $f_0$  a  $f_{30}$  a fluorescência registada no minuto zero ( $f_0$ ) e nos outros minutos até ao minuto 30.

A atividade antioxidante, expressa em  $\mu\text{mol}$  de equivalentes de trolox por grama de peso fresco de mirtilos, foi quantificada por interpolação de uma reta de regressão linear entre os valores

das concentrações de trolox e a área sob a curva de decaimento da fluoresceína obtida com as diversas concentrações de trolox testadas, após a subtração da área obtida no ensaio em branco.

### **3.8 Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica através do Teste de Ames**

O teste de Ames ou “bacterial reverse mutagenicity test”, desenvolvido por Bruce Ames em 1975, deteta o potencial mutagênico de substâncias através da indução da mutação reversa no operão histidina em mutantes de *Salmonella typhimurium* LT2. Este teste é um dos testes de curto termo mais utilizados em toxicologia genética para determinar a mutagenicidade de compostos puros ou de misturas complexas, como, por exemplo, extratos obtidos a partir de alimentos (Maron & Ames, 1983).

O teste de Ames utiliza estirpes de *Salmonella typhimurium* com diferentes mutações em vários genes do operão histidina, e que, por isso, se encontram impedidas de sintetizar este aminoácido (*his*<sup>-</sup>). Quando estas estirpes crescem num meio de cultura sem histidina (meio mínimo contendo apenas sais minerais e uma fonte de carbono e azoto), apenas uma pequena percentagem de células, característica de cada estirpe, é capaz de reverter espontaneamente a mutação e tornar-se prototrófica para a histidina (*his*<sup>+</sup>), conseguindo, por isso, crescer e formar colónias. A exposição destas estirpes a agentes mutagénicos conduz a um aumento da taxa de reversão da mutação e, consequentemente, a um aumento do número de células prototróficas para a histidina. Assim, quando um mutagénico é adicionado ao meio, o número de revertentes aumenta proporcionalmente à dose de mutagénico utilizado (revisto em Mortelmans & Zeiger, 2000).

A realização do teste consiste em adicionar uma quantidade fixa de bactérias (cerca de 10<sup>8</sup>) com quantidades variáveis do composto a testar e em plaquear estas misturas em meio de cultura contendo uma quantidade mínima e limitante de histidina (geralmente 0,05 mM). As placas são incubadas a 37 °C, durante 48 horas, sendo, então, contado o número de colónias de revertentes. A baixa concentração de histidina no meio permite que as bactérias se dividam um número limitado de vezes, de modo a que as lesões que tenham ocorrido no DNA possam ser fixadas em mutações. Durante o crescimento surge na placa uma turvação característica (“background”) visível a olho nu, que pode funcionar como um indicador de citotoxicidade, uma vez que a sua ausência indica que o composto em estudo levou a uma morte celular generalizada. Quando a histidina do meio se esgota, apenas as bactérias que reverteram a mutação, bactérias que passaram a *his*<sup>+</sup>, conseguem continuar a crescer formando colónias isoladas (revisto em Mortelmans & Zeiger, 2000).



Os resultados são expressos em termos de número de revertentes/placa ou número de revertentes/quantidade de substância testada (revisto em Mortelmans & Zeiger, 2000). Um composto é considerado positivo no teste de Ames quando se obtém um efeito consistente de dose-resposta, isto é, quando se observa um aumento do número de revertentes com o aumento da concentração e, simultaneamente, quando para uma das doses estudadas se observa uma duplicação do número de revertentes espontâneos. A atividade mutagénica específica pode ser calculada pelo declive da parte linear da curva de dose-resposta.

### **3.8.1. Caracterização da estirpe de *S. typhimurium* utilizada**

No presente trabalho utilizou-se a estirpe TA100 de *S. typhimurium* gentilmente cedida pelo Departamento de Genética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa. Trata-se de uma estirpe com uma mutação por substituição de base, na qual o códon CTC da estirpe selvagem foi substituída por CCC no alelo *hisG46*. Para além desta mutação no operão da histidina, a estirpe TA100 exhibe outras características genóticas adicionais que aumentam a sua sensibilidade para a deteção de mutagénicos. Estas mutações adicionais incluem a mutação *rfa*, que causa a perda parcial da barreira lipopolissacárida aumentando a permeabilidade da parede celular bacteriana a moléculas de grande dimensão; A deleção *uvrB*, que corresponde a uma deleção do gene que codifica para uma das enzimas envolvidas no sistema de reparação de DNA por excisão; E a inserção do plasmídeo pKM101, que confere resistência à ampicilina, e que contém os genes de um sistema de reparação errónea, o que permite aumentar a frequência de mutação. A deleção *uvrB* abrange parte do gene que codifica para a biotina, o que torna esta estirpe incapaz de crescer na ausência desta vitamina. Esta estirpe apresenta um número de revertentes espontâneos que varia entre 150 e 210 (Maron & Ames, 1983; Mortelmans & Zeiger, 2000).

### **3.8.2. Realização dos testes de Ames**

Para avaliar a atividade mutagénica e antimutagénica dos diferentes extratos de mirtilo estudados, procedeu-se à realização do teste de Ames, na variante de ensaio com pré-incubação, conforme o descrito por Maron & Ames (1983). Foi preferida esta variante, pois ela permite aumentar a sensibilidade do teste, tendo em conta que as bactérias ficam expostas aos compostos em estudo durante algum tempo antes de efetuar a sua diluição na placa de Petri (Maron & Ames, 1983). Todos os ensaios foram efetuados em triplicado.

A estirpe TA100 foi inoculada em 5 mL de meio NB, incubada durante 12 a 16 horas, a 37 °C, com agitação (210 rpm) e ao abrigo da luz, numa incubadora orbital, tendo sido mantida ao abrigo da luz e à temperatura de 4 °C até à realização do ensaio.

Para a realização dos ensaios de mutagenicidade, os diferentes volumes dos extratos analisados, entre 0 e 1000  $\mu\text{L}$ , foram misturados com 250  $\mu\text{L}$  de tampão de fosfatos de sódio (0,2 M, pH 7,4) e 100  $\mu\text{L}$  da cultura bacteriana. Para que o volume final em todas as misturas de pré-incubação fosse o mesmo, este foi sempre ajustado com água estéril até ao volume final de 1350  $\mu\text{L}$ . As misturas assim preparadas foram incubadas a 37 °C e 210 rpm, durante 20 minutos numa incubadora orbital. Após a incubação adicionou-se a cada tubo 2 mL de gelose de superfícies (“top-agar”) (Tabela 3.1) fundida a 100 °C e arrefecida até 45 °C. Esta mistura foi então agitada e plaqueada em placas de Petri com meio VB (Tabela 3.2). As placas foram incubadas invertidas em estufa a 37 °C durante 48 horas, procedendo-se então à contagem manual das colónias de revertentes *his*<sup>+</sup> para cada concentração.

**Tabela 3.1:** Composição da gelose de superfícies por litro (Maron & Ames, 1983).

Reagentes	Quantidade / Concentração
Agar	6 g
NaCl	5 g
Histidina	0,05 mM
Biotina	0,05 mM

Na preparação da gelose de superfície a histidina e a biotina foram adicionadas após esterilização da mistura de NaCl e agar, a partir de uma solução estéril e equimolar de histidina e de biotina (0,5 mM). Após esta suplementação a gelose de superfície foi imediatamente distribuída, em alíquotas de 2 mL, por tubos de vidro esterilizados.

**Tabela 3.2:** Composição do meio VB (por litro) (Maron & Ames, 1983).

Reagentes	Quantidade (g)
Glucose	20
Agar	15
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10
NaH <sub>2</sub> NH <sub>4</sub> PO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	3,5
Ácido cítrico monohidratado	2
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2

O meio VB resulta da mistura, após esterilização, de soluções de agar (1,5%), glucose (40%) e de uma solução de sais composta por MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (10g/L), ácido cítrico monohidratado (100g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (500g/L) e NaH<sub>2</sub>NH<sub>4</sub>PO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O (175g/L).

Nos ensaios de atividade antimutagénica procedeu-se da mesma forma descrita para os ensaios de mutagenicidade, com a diferença que as misturas de pré incubação continham, simultaneamente, um volume fixo (10  $\mu\text{L}$ ) de uma solução de t-BHP (10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), preparada de fresco, por diluição em água estéril, a partir da respetiva solução comercial. Esta quantidade corresponde a uma concentração final de 1,11  $\mu\text{mol}$  de t-BHP/placa. A atividade antimutagénica, expressa em percentagem de inibição da mutagenicidade, foi calculada através da seguinte expressão (Yen & Chen, 1995):

$$\% \text{Inibição} = [(RI-RE)-(RIM-RE)] \times 100/(RI-RE)$$

Sendo RI o número de revertentes induzidos pelo mutagêneo, RE o número de revertentes espontâneos e RIM o número de revertentes induzidos pelo mutagêneo na presença dos extratos em estudo.

### **3.9. Análise estatística dos dados**

O tratamento estatístico dos dados foi efetuado utilizando o “software” Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, Washington). Nesse sentido foram realizados, entre outros, o teste t, correlações, regressões lineares e análise ANOVA.

## 4. Resultados e discussão

Com o objetivo de estudar a evolução das propriedades bioativas dos mirtilos ao longo da sua maturação, estudaram-se duas variedades deste fruto, nomeadamente as variedades O’Neal e Earliblue, produzidas pela Mirtilusa, na região de Sever do Vouga, em condições de agricultura convencional, em diferentes fases de maturação. Assim, estas variedades foram estudadas num estado de maturação precoce (bagas avermelhadas) e no estado de plena maturação em que são comercializados (coloração azul arroxeada) (Figura 1.11).

Com o objetivo de avaliar a influência do clima e das técnicas de cultivo nas mesmas propriedades bioativas, estudou-se ainda a variedade O’Neal, no estado de plena maturação, quando produzida pela Mirtisul, na zona de Grândola, em condições de cultura biológica. A tabela 4.1 apresenta as abreviaturas utilizadas para designar as várias amostras estudadas.

**Tabela 4.1:** Abreviaturas utilizadas para designar as várias amostras estudadas.

Amostras	Abreviatura
Variedade O’Neal, produzida na Mirtisul e colhida em plena maturação (maduro)	O’Neal_MS_M
Variedade O’Neal, produzida na Mirtilusa e colhida em maturação precoce (verde)	O’Neal_ML_V
Variedade O’Neal, produzida na Mirtilusa e colhida em plena maturação (maduro)	O’Neal_ML_M
Variedade Earliblue, produzida na Mirtilusa e colhida em maturação precoce (verde)	Earliblue_ML_V
Variedade Earliblue, produzida na Mirtilusa e colhida em plena maturação (maduro)	Earliblue_ML_M

### 4.1. Grau Brix

A tabela 4.2 mostra os valores de grau Brix das diferentes amostras estudadas. Os valores de Brix das amostras variaram entre 9,8, para a amostra Earliblue\_ML\_V, e 15,1%, para a amostra O’Neal\_MS\_M. Estes valores encontram-se dentro das gamas reportadas por outros autores para diversas variedades de *V. corymbosum* cultivadas em diversos estados dos Estados Unidos da América (Prior *et al.*, 1998) ou na zona dos Apeninos em Itália (Giovanelli & Buratti, 2009). Não se verificaram diferenças significativas entre os valores de grau Brix da variedade O’Neal em estado de plena maturação quando cultivada em cultura biológica em Grândola (O’Neal\_MS\_M) ou em cultura convencional na zona de Sever do Vouga (O’Neal\_ML\_M). Da mesma forma, também não se verificaram diferenças significativas entre os valores de grau Brix das duas variedades estudadas quando estas se encontram em igual estado de maturação.

As únicas situações em que se verificaram diferenças significativas entre os valores de grau Brix foram entre as amostras verdes e as amostras maduras. Com efeito, os mirtilos apresentaram menor teor em açúcar no estado de maturação precoce (Earliblue\_ML\_V e O'Neal\_ML\_V) do que no estado de plena maturação (Earliblue\_ML\_M e O'Neal\_ML\_M). Estes resultados estão de acordo com outros obtidos para variedades de mirtilo “Rabbiteye” e eram esperados uma vez que, de um modo geral, o teor em açúcar dos frutos vai aumentando durante o seu amadurecimento (Prior *et al.*, 1998).

**Tabela 4.2:** Valores de Grau Brix das amostras estudadas.

Amostras	Grau Brix (%)
O'Neal_MS_M	15,1 <sup>a</sup> ± 2,7
Earliblue_ML_V	9,8 <sup>b</sup> ± 1,4
O'Neal_ML_V	10,4 <sup>bc</sup> ± 1,3
Earliblue_ML_M	11,9 <sup>ac</sup> ± 0,4
O'Neal_ML_M	12,2 <sup>a</sup> ± 0,7

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste t (p<0,05)

## 4.2. Determinação dos fenóis totais pelo Método de Folin-Ciocalteu

Os compostos fenólicos totais, expressos em mg equivalentes de ácido gálico por 100 g de fruto, foram determinados utilizando o método Folin-Ciocalteu (Tabela 4.3).

**Tabela 4.3:** Teor em Fenóis totais expresso por 100 g de fruto, das amostras em estudo.

Amostras	Fenóis totais (mg eq. ác. gálico/100g)
O'Neal_MS_M	140,8 <sup>a</sup> ± 1,7
Earliblue_ML_V	66,1 <sup>b</sup> ± 5,2
O'Neal_ML_V	71,3 <sup>b</sup> ± 1,8
Earliblue_ML_M	161,0 <sup>c</sup> ± 3,4
O'Neal_ML_M	147,2 <sup>d</sup> ± 1,5

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste t (p<0,05).

Por análise da tabela 4.3 verifica-se que para as variedades em plena maturação o teor de fenóis totais variou entre 140,8, para a variedade O'Neal\_MS\_M e 161,0 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de fruto para a Earliblue\_ML\_M. Estes valores estão de acordo com os valores apresentados por Koca & Karadeniz (2009) para mirtilos de outras variedades, cultivados na região do

mar negro, na Turquia, e com os valores reportados por Ehlenfeldt & Prior (2001) para as mesmas variedades de mirtilos, cultivadas em Nova Jersey, nos Estados Unidos da América. Neste último estudo os valores foram de 139 e 176 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de fruto para a variedade O'Neal e Earliblue, respetivamente. Outros autores descrevem teores de fenóis totais superiores aos obtidos neste trabalho, chegando a ser superiores a 300 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de fruto, em outras cultivares de *V. corymbosum*, especialmente para variedades “Rabbiteye”, sendo ainda mais elevados, superiores a 500 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de fruto, em mirtilos selvagens (Prior *et al.*, 1998; Ehlenfeldt & Prior, 2001; Giovanelli & Buratti, 2009; Koca & Karadeniz, 2009; You *et al.*, 2011; Bunea *et al.*, 2011).

Pela análise dos resultados é possível concluir que o teor em fenóis totais é significativamente diferente entre as duas amostras da variedade O'Neal produzidas na Mirtilusa e na Mirtisul na fase de maturação em que são recolhidos para venda. Assim, a variedade O'Neal produzida na Mirtilusa apresenta um teor mais elevado de fenóis totais (147,2 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de fruto), que a variedade O'Neal produzida na Mirtisul (140,8 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de fruto). Estas diferenças podem refletir as diferenças de clima, condições de solo e de cultivo que se verificam entre as duas zonas de produção. Wang e colaboradores (2008) descreveram que a variedade de *V. corymbosum* Bluecrop, cultivada no estado de New Jersey (Estados Unidos da América), atingia, quando cultivada em condições de agricultura biológica, valores de fenóis totais quase duas vezes superiores aos valores obtidos em modo de agricultura convencional. Também em variedades de *V. virgatum* (variedades “Rabbiteye”) produzidas em modo de agricultura biológica (Alabama, Estados Unidos da América) se verificaram valores mais elevados de fenóis totais do que quando estas são produzidas em modo convencional, embora, neste caso, as diferenças não sejam tão acentuadas como as verificadas com a variedade Bluecrop (Wang *et al.*, 2008; You *et al.*, 2011). Os resultados obtidos estão, assim, em desacordo com os de Wang e colaboradores (2008) e com os de You e colaboradores (2011), uma vez que, no presente trabalho foram os mirtilos de agricultura convencional os que apresentaram o valor mais elevado de fenóis totais. Assim, ou variedade O'Neal não é tão sensível aos métodos de cultivo como as variedades Bluecrop ou as variedades “Rabbiteye”, ou as diferenças de clima e/ou de tipo de solo tiveram uma influência mais marcante no teor em fenóis totais do que o modo de cultivo.

Ambas as variedades produzidas na Mirtilusa apresentaram um maior teor em fenóis totais em fase de plena maturação do que em fase de maturação mais precoce. Assim, no estado de plena maturação a variedade Earliblue apresentou um teor em fenóis totais significativamente superior ao da variedade O'Neal (161,0 contra 147,2 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de fruto). O facto de todas as plantas terem estado sujeitas aos mesmos fatores de cultivo (mesma localização e ano de produção) elimina os efeitos de diferenças climáticas, níveis de radiação UV, temperatura ambiente, “stress” hídrico, composição do solo e disponibilidade de fatores nutricionais. Assim, as diferenças

observadas devem estar principalmente relacionadas com as diferenças genéticas entre as duas cultivares. Também Ehlenfeldt e Prior (2001), encontram valores de fenóis totais superiores na variedade Earliblue do que na O’Neal cultivadas no estado de New Jersey (Estados Unidos da América).

### 4.3. Quantificação das antocianinas monoméricas totais pelo método do pH diferencial

**Tabela 4.4:** Teor em Antocianinas totais expresso por 100 g de fruto, das amostras em estudo.

Amostras	Antocianinas totais (mg eq. cianidina/100 g)
O’Neal_MS_M	36,3 <sup>a</sup> ± 0,3
Earliblue_ML_V	17,6 <sup>b</sup> ± 0,2
O’Neal_ML_V	13,8 <sup>c</sup> ± 0,2
Eearliblue_ML_M	47,0 <sup>d</sup> ± 0,4
O’Neal_ML_M	46,1 <sup>d</sup> ± 0,7

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste t (p<0,05).

O teor em antocianinas para as variedades em plena maturação variou entre os 36,3 para a variedade O’Neal\_MS\_M e os 47,0 mg equivalentes de cianidina/100 g de fruto para a variedade Eearliblue\_ML\_M (Tabela 4.4).

Tal como verificado com o teor em fenóis, também o teor em antocianinas foi mais elevado na variedade O’Neal produzida na Mirtilusa, em modo de agricultura convencional, do que na mesma variedade produzida na Mirtisul, em modo de agricultura biológica. Estes resultados contrariam os obtidos por Wang e colaboradores (2008) que descreveram que a variedade de *V. corymbosum* Bluecrop atingia, quando cultivada em condições de agricultura biológica, valores de antocianinas totais quase duas vezes superiores aos valores obtidos em modo de agricultura convencional, bem como os de You e colaboradores (2011) que descrevem a ausência de diferenças significativas nos teores em antocianinas totais de variedades de *V. virgatum* (variedade “Rabbiteye”) cultivadas em modo biológico ou convencional. Assim, mais uma vez se pode dizer que ou variedade O’Neal não é tão sensível aos métodos de cultivo como a variedade Bluecrop ou as diferenças de clima e/ou de tipo solo tiveram uma influência mais marcante no teor em antocianinas totais do que o modo de cultivo.

Ao contrário do que se verificou com o teor em fenóis totais, no caso do teor em antocianinas, ambas as variedades produzidas na Mirtilusa apenas apresentaram diferenças significativas quando se encontravam no estado de maturação mais precoce. No entanto, em ambas as variedades o teor em antocianinas foi sempre mais elevado no estado de plena maturação do que no estado de maturação precoce.

Os valores obtidos para ambas as variedades foram inferiores aos obtidos, por outros autores, para as mesmas variedades de mirtilos cultivadas em Nova Jersey, nos Estados Unidos da América (Ehlenfeldt & Prior, 2001). Outros autores, estudando outras cultivares de *V. corymbosum*, obtiveram valores de antocianinas monoméricas totais superiores aos obtidos neste trabalho, variando entre 92 e 126 mg equivalentes de cianidina/100 g de fruto (Prior *et al.*, 1998; Connor *et al.*, 2002; Giovanelli & Buratti, 2009). Nos mirtilos analisados as antocianinas representaram cerca de 30% dos fenóis totais quando no estado de plena maturação encontrando-se no limite mínimo daquilo que é reportado por outros autores (valores entre 30 e 60%) (Prior *et al.*, 1998; Ehlenfeldt & Prior, 2001; Giovanelli & Buratti, 2009). Tal como verificado com o teor em fenóis totais, também em relação às antocianinas se verifica que os mirtilos selvagens apresentam teores muito superiores aos das variedades cultivadas (cerca 350 mg equivalente de cianidina/100 g de fruto), encontrando-se presentes quer na polpa quer na epiderme do fruto pois, ao contrário das variedades cultivadas, a polpa dos mirtilos selvagens tem, igualmente, uma coloração avermelhada (Giovanelli & Buratti, 2009).

#### **4.4. Atividade antioxidante das diferentes amostras de mirtilo**

Para a caracterização da atividade antioxidante das variedades de mirtilo em estudo procedeu-se à avaliação da sua capacidade de quelação do ferro (II), da sua capacidade redutora (ensaios FRAP e CUPRAC) e, por fim, avaliação da sua capacidade de sequestro de espécies reativas de oxigénio, nomeadamente do peróxido de hidrogénio e dos radicais anião superóxido e peróxido (ensaio ORAC).

##### **4.4.1. Determinação da capacidade de quelação de Fe (II)**

Os iões  $\text{Fe}^{2+}$  podem gerar espécies reativas de oxigénio ao reagirem com o peróxido de hidrogénio ou com hidroperóxidos lipídicos, através das reações de Fenton. Desta forma, a capacidade de quelação deste metal pode ser encarada como um mecanismo de atividade antioxidante (Geckil *et al.*, 2005).

Dependendo da sua estrutura, os compostos fenólicos têm maior ou menor afinidade química para com os catiões dos metais de transição, tendo, assim, capacidade para os complexar, tornando-os indisponíveis para participar nas reações de Fenton. Esta característica dos polifenóis faz com que



extratos preparados a partir de alimentos com elevada concentração destes compostos possam, igualmente, apresentar capacidade de quelação de iões metálicos. Com efeito, extratos de plantas aromáticas (Dorman *et al.*, 2003 e 2004), de própolis (Geckil *et al.*, 2005) ou de bagas de zimbro (Miceli *et al.*, 2009) têm mostrado capacidade de quelação de Fe(II).

Contudo, nos extratos de mirtilos analisados no presente trabalho não foi possível detetar nenhuma quelação do Fe(II), uma vez que não se verificou inibição da formação dos complexos entre o Fe(II) e a ferrozina, com nenhuma das amostras testadas até uma concentrações de 50 mg/mL. Este resultado indica que os compostos fenólicos presentes nos extratos de mirtilos, tanto no estado de maturação precoce como no estado de plena maturação, ou não têm capacidade de quelar o Fe(II) ou têm uma afinidade para com este ião inferior à da ferrozina.

#### 4.4.2 Determinação da capacidade redutora pelos ensaios FRAP e CUPRAC

A capacidade antioxidante por atividade redutora (mecanismo de transferência eletrónica) foi avaliada por dois métodos distintos: o ensaio FRAP e o ensaio CUPRAC. O ensaio FRAP é um dos métodos mais comuns de avaliação da capacidade antioxidante. O ensaio CUPRAC tem, em relação ao ensaio FRAP, as vantagens de se realizar a um pH com maior significado fisiológico (pH 7 contra pH 3,6) e de conseguir detetar antioxidantes do tipo tiol, como a glutatona ou a cisteína, uma vez que a configuração eletrónica do ião Cu(II) lhe permite uma cinética redox mais rápida do que a do ião Fe(III). Por outro lado, o facto do potencial redox para o par Cu(II)-neocuproína/Cu(I)-neocuproína ser inferior ao do Fe(III)/Fe(II) com os respetivos ligandos do FRAP faz com que determinados compostos, tais como açúcares simples ou o ácido cítrico, não possam ser reduzidos no ensaio CUPRAC podendo-o ser no ensaio FRAP (Apak *et al.*, 2004).

Os resultados dos ensaios FRAP e CUPRAC obtidos com as diferentes amostras de mirtilos em estudo encontram-se na tabela 4.5.

**Tabela 4.5:** Valores obtidos nos ensaios FRAP e CUPRAC expressos por 100 g de fruto.

Amostras	Valor FRAP (mmol de Fe <sup>2+</sup> /100 g)	Valor CUPRAC (mmol eq de ácido ascórbico/100 g)
O'Neal_MS_M	1,19 <sup>a</sup> ± 0,01	0,99 <sup>a</sup> ± 0,01
Earliblue_ML_V	0,65 <sup>b</sup> ± 0,01	0,57 <sup>b</sup> ± 0,02
O'Neal_ML_V	0,59 <sup>c</sup> ± 0,01	0,53 <sup>c</sup> ± 0,01
Earliblue_ML_M	1,28 <sup>d</sup> ± 0,04	1,11 <sup>d</sup> ± 0,03
O'Neal_ML_M	1,17 <sup>a</sup> ± 0,02	1,11 <sup>d</sup> ± 0,01

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste t (p<0,05).

Através da análise da tabela 4.5 pode verificar-se que os valores de FRAP para as amostras em plena maturação variaram entre 1,17 e 1,28 mmol de  $\text{Fe}^{2+}$ /100 g, enquanto os valores de CUPRAC variaram entre 0,99 e 1,11 mmol equivalentes de ácido ascórbico/100 g de fruto. Os valores de FRAP aproximaram-se dos valores reportados por Koca & Karadeniz (2009) para outras variedades de mirtilos cultivados na região do mar negro na Turquia (entre 0,756 e 1,369 mmol  $\text{Fe}^{2+}$ /100 g), sendo, no entanto inferiores a outros obtidos com diferentes variedades de mirtilos cultivados e, especialmente, de mirtilos selvagens (Giovaneli & Buratti, 2009; Koca & Karadeniz, 2009).

A variedade O'Neal apresentou um valor de CUPRAC mais elevado quando produzida na Mirtilusa do que na Mirtisul. Contudo, em relação aos valores de FRAP, os mirtilos provenientes dos dois locais de produção não apresentaram diferenças significativas.

Em relação às duas variedades produzidas na Mirtilusa, a variedade Earliblue apresentou um valor de FRAP mais elevado do que a variedade O'Neal, quer quando ambas se encontravam em estado de plena maturação, quer em estado de maturação precoce, apresentando, igualmente um valor de CUPRAC mais elevado, mas apenas quando ambas as variedades se encontram com menor grau de maturação. Para ambas as variedades a atividade antioxidante, quer determinada pelo ensaio FRAP, quer pelo ensaio CUPRAC, aumentou sempre com o grau de maturação das bagas.

#### **4.4.3. Determinação da atividade antioxidante por sequestro de ROS**

A capacidade antioxidante por sequestro de espécies reativas de oxigénio foi avaliada determinando a capacidade das amostras para desativar três das mais importantes espécies reativas de oxigénio, que se podem formar *in vivo* no organismo humano: o peróxido de hidrogénio, o radical anião superóxido e o radical peroxilo. Assim, estes ensaios são importantes pois permitem estudar a capacidade de sequestro de oxidantes com relevância fisiológica. O peróxido de hidrogénio pode ser produzido, em condições fisiológicas, por ação de diversas enzimas como a glucose oxidase ou a superóxido dismutase. O radical anião superóxido resulta da redução do oxigénio molecular e pode surgir no decurso de diversos processos metabólicos. A desativação do radical peroxilo é importante devido ao papel que este radical desempenha na propagação das reações de peroxidação lipídica.

A tabela 4.6 mostra os resultados obtidos nos ensaios de sequestro de espécies reativas de oxigénio.

**Tabela 4.6:** Atividade antioxidante por sequestro de espécies reativas de oxigénio

Amostras	% Sequestro de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	% Sequestro do anião superóxido	ORAC μmol de eq. de trolox/g de fruto
O'Neal_MS_M	18,0 <sup>a</sup> ± 2,8	93,9 <sup>a</sup> ± 1,5	10,5 <sup>a</sup> ± 0,9
Earliblue_ML_V	10,7 <sup>b</sup> ± 1,0	88,5 <sup>a</sup> ± 1,9	5,9 <sup>b</sup> ± 0,5
O'Neal_ML_V	10,6 <sup>b</sup> ± 0,2	89,1 <sup>a</sup> ± 0,3	6,4 <sup>b</sup> ± 0,2
Earliblue_ML_M	19,5 <sup>a</sup> ± 0,9	93,6 <sup>a</sup> ± 0,01	14,5 <sup>c</sup> ± 0,8
O'Neal_ML_M	22,4 <sup>c</sup> ± 0,8	93,6 <sup>a</sup> ± 0,01	12,8 <sup>c</sup> ± 1,2

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste t (p<0,05)

Através da análise da tabela 4.6 pode concluir-se que todas as amostras apresentaram capacidade para desativar as três espécies reativas de oxigénio em análise. Com exceção do sequestro do radical anião superóxido, em que não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre nenhuma das amostras, foi possível observar um aumento da capacidade de sequestro com o aumento do grau de maturação das bagas, tanto para a variedade Earliblue como para a variedade O'Neal. Em relação à variedade O'Neal foi possível observar que as amostras provenientes de Sever do Vouga (Mirtilusa) apresentaram uma capacidade de sequestro tanto do peróxido de hidrogénio, como do radical peroxilo, maior do que as amostras provenientes de Grândola (Mirtisul). A ausência de diferenças significativas entre as várias amostras no ensaio do sequestro do radical anião superóxido pode ter sido o resultado das condições experimentais utilizadas, nomeadamente o volume de amostra utilizado (200 μL de amostra por ensaio) que pode ter sido demasiado elevado para permitir observar diferentes respostas.

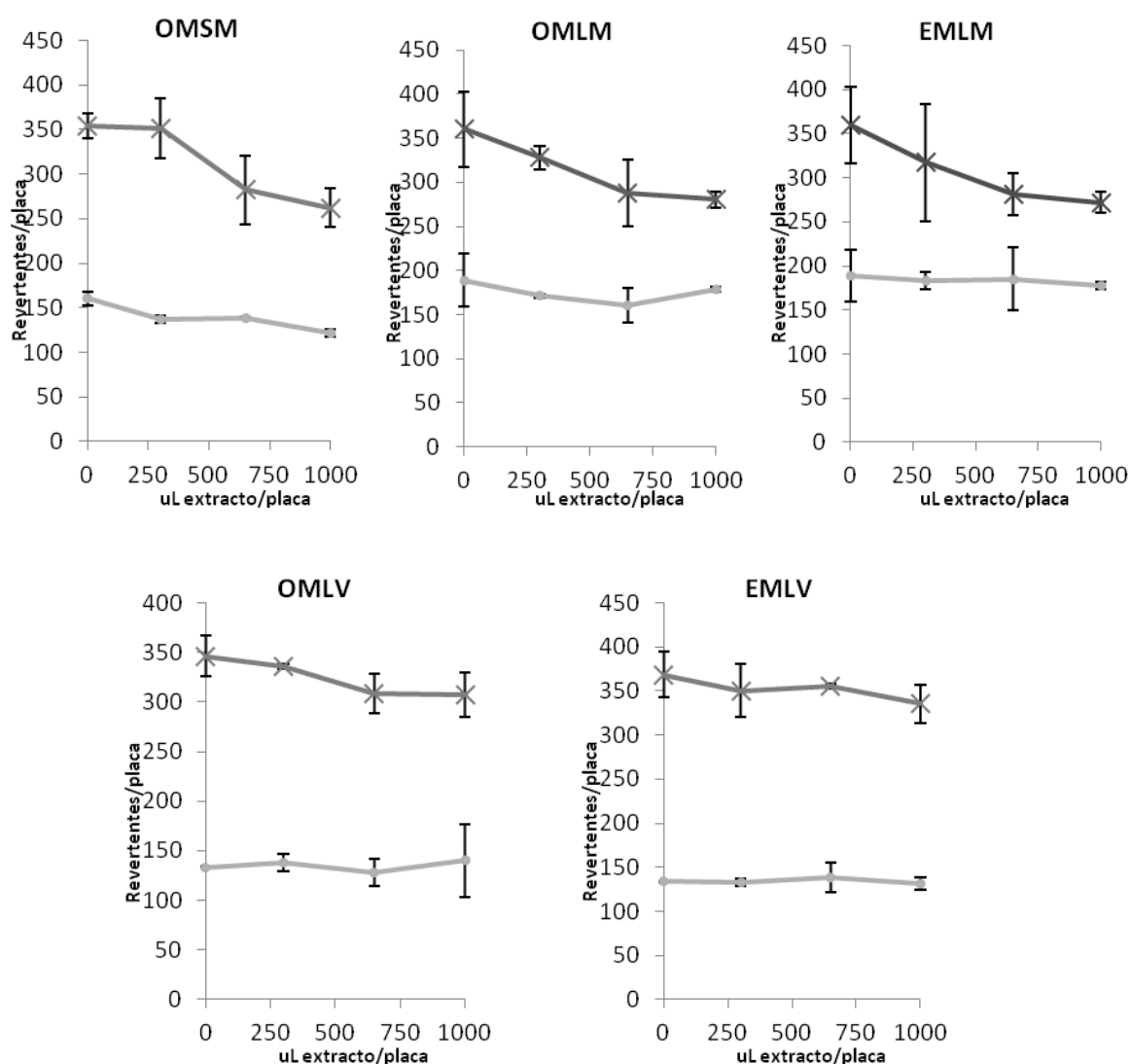
Entre as duas variedades produzidas na Mirtilusa apenas se verificaram diferenças significativas quando estas se encontravam em plena maturação, sendo a variedade Earliblue aquela que mais se destacou no sequestro do radical peroxilo e a variedade O'Neal a que mais se destacou no sequestro do peróxido de hidrogénio.

Os valores de ORAC obtidos para as amostras em plena maturação foram ligeiramente inferiores aos valores reportados por Ehlenfeldt & Prior (2001) para as mesmas variedades de mirtilos cultivadas em Nova Jersey, nos Estados Unidos da América (14,1 μmol de equivalentes de trolox/g de fruto para a variedade O'Neal e 19,7 μmol de equivalentes de trolox/g de fruto para a Earliblue). Contudo, esta comparação pode estar afetada de algum erro uma vez que no ensaio realizado por Ehlenfeldt & Prior (2001) o composto fluorescente utilizado foi a R-ficoeritrina enquanto que no presente ensaio foi a fluoresceína. Outros autores reportam valores de ORAC bastante mais elevados, valores até 55,7 μmol de eq. trolox/g de fruto, para outras variedades de mirtilos (Prior *et al.*, 1998; Ehlenfeldt e Prior, 2001; You *et al.*, 2011).

## 4.5. Avaliação da atividade mutagénica e antimutagénica através do teste de Ames

A avaliação da atividade antimutagénica dos diferentes extratos de mirtilo foi efetuada através da observação da capacidade das amostras para reduzir a mutagenicidade do mutagénico oxidativo *tert*-butil-hidroperóxido (t-BHP), tendo este ensaio sido realizado na estirpe TA100.

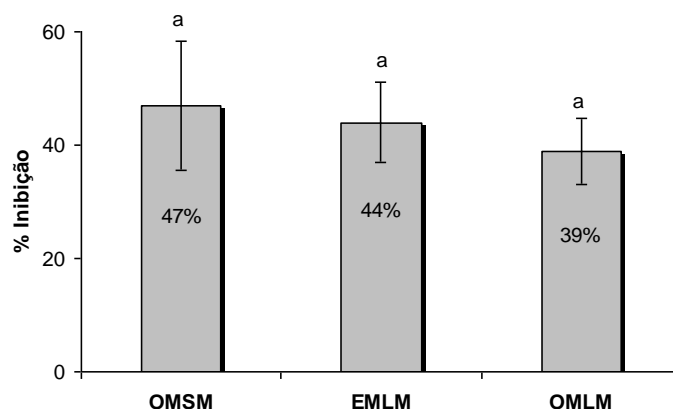
Como se pode observar na figura 4.1 quando testadas isoladamente (curvas a cinzento, --), isto é, sem adição de t-BHP, as diversas amostras de mirtilo estudadas não apresentaram, nas doses testadas, mutagenicidade na estirpe TA100, uma vez que o número de revertentes obtido foi sempre semelhante ao número de revertentes espontâneos. Também se pode observar que as amostras O'Neal\_MS\_M, O'Neal\_ML\_M e Earliblue\_ML\_M conseguem reduzir a mutagenicidade do t-BHP, uma vez que número de revertentes induzidos, por este mutagénico, foi diminuindo à medida que se aumentou a dose de amostra. O facto do número de revertentes nunca ter descido para valores inferiores aos revertentes espontâneos, em paralelo com a existência de um patamar no final da curva de dose-resposta das várias amostras na presença do mutagénico, prova a ideia de que a diminuição do número de revertentes por placa é resultado da diminuição do número de revertentes induzidos pelo t-BHP, não sendo, por isso, resultado da morte das bactérias devida a toxicidade aguda. Esta observação vem assim reforçar a ideia de que estas amostras apresentam atividade antimutagénica. No caso das amostras O'Neal\_ML\_V e Earliblue\_ML\_V, verificou-se que o número de revertentes induzidos pelo t-BHP (curva a preto) não se alterou, de forma significativa, com o aumento da dose de amostra, pelo que, neste estado de maturação, não se observou atividade antimutagénica com ambas as variedades.



**Figura 4.1:** Curvas de dose-resposta das amostras O’Neal\_MS\_M (**OMSM**), O’Neal\_ML\_M (**OMLM**), Earliblue\_ML\_M (**EMLM**), O’Neal\_ML\_V (**OMLV**) e Earliblue\_ML\_V (**EMLV**) na presença (-x-) e na ausência (-\*-) de t-BHP, na estirpe TA100.

Na figura 4.2 encontram-se as percentagens de inibição da mutagenicidade do t-BHP obtidas com 1 mL de extrato/placa para as amostras que apresentaram atividade antimutagénica, ou seja, para as amostras em plena maturação. Estas percentagens de inibição foram de 47%, 44% e 39%, para as amostras O’Neal\_MS\_M, Earliblue\_ML\_M e O’Neal\_ML\_M, respetivamente. No entanto, dada a variação dos resultados, estas percentagens de inibição não foram significativamente diferentes de acordo com o teste t ( $p < 0,05$ ). Assim, embora de forma moderada, uma vez que as percentagens de inibição não chegaram aos 50%, todas as amostras em plena maturação apresentaram atividade antimutagénica. Desta forma, a atividade antimutagénica das bagas foi independente da variedade

(O'Neal ou Earliblue), e do clima e/ou das condições de produção (Mirtilusa ou Mirtisul), tendo sido dependente do grau de maturação.



**Figura 4.2:** Percentagem máxima de inibição da mutagenicidade do t-BHP exercida pelas amostras O'Neal\_MS\_M (OMSM), Earliblue\_ML\_M (EMLM) e O'Neal\_ML\_M (OMLM). Amostras com letras diferentes significam percentagens de inibição significativamente diferentes de acordo com o teste t ( $p < 0.05$ ).

## 4.6. Análise global aos resultados

Com o objetivo de tentar estabelecer relações entre a composição em compostos fenólicos totais, antocianinas e grau Brix das amostras estudadas e as suas respectivas atividades antioxidantes e antimutagénicas efetuaram-se várias correlações lineares. Nesse sentido determinaram-se as equações das retas que melhor se ajustavam aos vários pontos experimentais obtidos e foi determinado o respetivo coeficiente de correlação linear de Pearson ( $r$ ). Este coeficiente mede a intensidade da associação linear existente entre as variáveis e pode tomar valores entre -1 e 1 (Tabela 4.7).

**Tabela 4.7:** Classificação da correlação em função do coeficiente de correlação de Pearson (Santos, 2007).

Coeficiente de Pearson ( $r$ )	Tipo de correlação
$r = 1$	Perfeitamente positiva
$0,8 \leq r < 1$	Fortemente positiva
$0,5 \leq r < 0,8$	Moderadamente positiva
$0,1 \leq r < 0,5$	Fracamente positiva
$0 < r < 0,1$	Infimamente positiva
$r = 0$	Nula
$-0,1 < r < 0$	Infimamente negativa
$-0,5 < r \leq -0,1$	Fracamente negativa
$-0,8 < r \leq -0,5$	Moderadamente negativa
$-1 < r \leq -0,8$	Fortemente negativa
$r = -1$	Perfeitamente negativa

A tabela 4.8 mostra os valores de Coeficiente de Pearson para as correlações entre composição química e atividade antioxidante e antimutagénica das várias amostras. Assim, a partir da análise da tabela 4.8 é possível afirmar que se verifica uma correlação fortemente positiva entre o teor em fenóis totais e antocianinas e a capacidade antioxidante medida em todos os testes realizados (CUPRAC, FRAP, ORAC, sequestro do peróxido de hidrogénio e do anião superóxido) para os mirtilos estudados. Estes resultados apontam claramente no sentido das propriedades antioxidantes dos mirtilos se deverem, em grande parte, à presença dos compostos fenólicos e, em particular, das antocianinas.

**Tabela 4.8:** Coeficiente de Pearson para as correlações entre composição química e atividade antioxidante e antimutagénica das várias amostras.

	Fenóis	Antocianinas	CUPRAC	FRAP	Sequestro de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sequestro superóxido	ORAC	Grau Brix	Ames
Fenóis	1								
Antocianinas	0,9768	1							
CUPRAC	0,9884	0,9941	1						
FRAP	0,9911	0,9692	0,9837	1					
Sequestro de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,9484	0,9743	0,9805	0,9336	1				
Sequestro superóxido	0,9789	0,9357	0,9677	0,9783	0,9399	1			
ORAC	0,9726	0,9784	0,9668	0,9464	0,9313	0,9083	1		
Grau Brix	0,7076	0,5903	0,6717	0,7449	0,6319	0,8268	0,5254	1	
Ames	0,9756	0,9287	0,9600	0,9874	0,9129	0,9932	0,8986	0,8388	1

Verifica-se, igualmente, a existência de correlações fortemente positivas entre todos os ensaios de atividade antioxidante, o que parece indicar que os compostos envolvidos nestas atividades sejam maioritariamente os mesmos. Mesmo sem a realização das correlações, a simples observação dos resultados apresentados ao longo do presente capítulo já sugeria fortemente o envolvimento dos compostos fenólicos e, em particular das antocianinas, na atividade antioxidante dos mirtilos. Com efeito, as variedades em estado de maturação mais precoce apresentaram, em relação às variedades em estado de plena maturação, diferenças muito expressivas no teor em fenóis totais e em antocianinas, tendo essas diferenças sido bem refletidas nos diversos ensaios de atividade antioxidante.

A existência de correlações fortemente positivas entre o ensaio FRAP e os teores em fenóis e em antocianinas foi igualmente verificada por outros autores (Moyer *et al.*, 2002; Giovaneli & Buratti, 2009; Koca & Karadeniz, 2009; Bunea *et al.*, 2011). Também outros trabalhos mostram a existência de correlações positivas entre os valores de ORAC e o teor em fenóis totais e em antocianinas (Prior *et al.*, 1998; Kalt *et al.*, 1999; Ehlenfeldt & Prior, 2001; Moyer *et al.*, 2002; You *et al.*, 2011). No seu

conjunto, todos estes resultados suportam a hipótese dos compostos fenólicos estarem envolvidos no tipo de atividade antioxidante detetada por estes ensaios (FRAP e ORAC).

Foi ainda possível observar a existência de correlações moderadamente positivas entre o teor em sólidos solúveis totais (°Brix) e o teor em fenóis ( $r = 0,7076$ ) e em antocianinas ( $r = 0,5903$ ). Desta forma, verifica-se que o grau Brix parece variar de forma independente quer do teor em fenóis, quer, em particular, do teor em antocianinas, enquanto o teor em fenóis totais e em antocianinas variam de uma forma dependente. Foi, igualmente, possível verificar a existência de correlações moderadamente positivas entre o grau Brix e os ensaios FRAP ( $r = 0,7449$ ), CUPRAC ( $r = 0,6717$ ), ORAC ( $r = 0,5254$ ) e sequestro do peróxido de hidrogénio ( $r = 0,6319$ ). Assim, na sua globalidade, as correlações obtidas entre os vários parâmetros analisados e o grau Brix também apontam no sentido da existência de um forte envolvimento dos compostos fenólicos na atividade antioxidante dos mirtilos, detetada através dos diferentes ensaios realizados.

Os resultados do teste de Ames apresentaram uma correlação fortemente positiva com o teor em fenóis totais e antocianinas. Também foram encontradas correlações fortemente positivas entre o teste de Ames e todos os ensaios de determinação da capacidade antioxidante. Assim, os compostos fenólicos, e, em particular, as antocianinas, para além de parecerem contribuir de forma determinante para as propriedades antioxidantes dos mirtilos, também parecem estar fortemente envolvidas nas suas propriedades antimutagénicas.



## 5. Conclusão

A ideia de que os mirtilos são alimentos capazes de exercer efeitos benéficos na saúde de quem os consome tem vindo a ser sustentada por diversos trabalhos que comprovam que extratos preparados a partir destes frutos possuem diversas propriedades bioativas, como, por exemplo, propriedades antioxidantes ou anti-inflamatórias, que podem ser responsáveis pelos referidos benefícios para a saúde. Diversos desses trabalhos têm apontado os compostos fenólicos, que estes frutos possuem em elevada quantidade, como os principais responsáveis pelas suas potenciais propriedades bioativas. Apesar desse teor ser elevado, na generalidade das variedades de mirtilos, é sabido que quer a quantidade, quer o perfil exato destes compostos, podem variar, não só, com a cultivar e com o seu grau de maturação, como também com as condições de solo e clima ou com práticas agrícolas, podendo algumas destas diferenças ser resultado de diferentes graus de “stress” hídrico, da maior ou menor disponibilidade de nutrientes e da intensidade da radiação ultravioleta (Giovanelli e Buratti, 2009).

Neste contexto, a realização deste trabalho teve dois objetivos principais. O primeiro desses objetivos consistiu em avaliar o efeito do grau de maturação sobre as capacidades antioxidante e antimutagénica de duas variedades de mirtilo (Earliblue e O’Neal), produzidas e comercializadas pela Mirtilusa. Foram escolhidos dois graus de maturação não muito distantes um do outro, correspondendo um à fase comercial de maturação, quando os mirtilos já adquiriram a sua tonalidade azul arroxeada característica, e outro a uma fase mais precoce, quando a tonalidade das bagas é mais avermelhada.

O segundo objetivo deste trabalho consistiu em tentar avaliar a influência dos fatores ambientais (solo, clima, etc.) e/ou das técnicas de cultivo nas capacidades antioxidante e antimutagénica destes frutos. Para isso foi necessário estudar uma mesma variedade produzida em dois locais distintos. Em Portugal existem dois grandes locais de produção de Mirtilos: A Mirtilusa, na zona de Sever do Vouga, que produz mirtilos em modo de agricultura convencional, e a Mirtisul, na zona de Grândola, que produz estes frutos em modo de agricultura biológica. A única variedade comum aos dois locais de produção foi a variedade O’Neal sendo, por isso, esta a selecionada para efetuar este estudo.

Uma vez que não existe um método universal para a determinação da atividade antioxidante das amostras, visto esta poder ser exercida através de diferentes mecanismos, aplicaram-se diferentes ensaios, nomeadamente, ensaios de avaliação da capacidade redutora (FRAP e CUPRAC), da capacidade de sequestro de três das principais espécies reativas de oxigénio que podem formar-se *in vivo* (radical peróxido, peróxido de hidrogénio e radical anião superóxido) e a ainda da capacidade de

quelação de Fe(II). O potencial antimutagénico foi avaliado através do estudo da capacidade das amostras para inibirem a mutagenicidade do mutagénico oxidativo *tert*-butil-hidroperóxido (t-BHP).

Os resultados demonstram que o estado de maturação tem uma influência marcada nas propriedades antioxidantes e antimutagénicas dos mirtilos. Com efeito, em ambas as variedades estudadas, a atividade antioxidante foi sempre superior quando as variedades se encontravam no seu estado de maturação comercial. No que concerne à atividade antimutagénica, esta só se conseguiu detetar, embora de forma moderada, no estado de maturação mais avançado não se conseguindo detetar na fase de maturação mais precoce. Também o teor em fenóis e, em particular, em antocianinas foi sempre superior quando as variedades se encontravam no seu estado de maturação comercial, sugerindo o envolvimento destas duas classes de compostos químicos nas atividades biológicas estudadas. Também Prior e colaboradores (1998) estudando variedades de mirtilo “Rabbiteye” concluíram que o grau de maturação era determinante para a capacidade antioxidante destes frutos.

Em relação às duas variedades produzidas na Mirtilusa, nomeadamente as variedades Earliblue e O’Neal, verificou-se que, quando no estado de maturação comercial e na generalidade dos ensaios efetuadas, foi a variedade Earliblue a que mais se destacou em termos de propriedades bioativas. Com efeito, esta variedade foi a que apresentou maior teor em fenóis totais (161,0 mg de equivalentes de ácido gálico por 100 g de fruto), antocianinas (46,96 mg de equivalentes de cianidina por 100 g de fruto) e valores mais elevados nos ensaios FRAP e ORAC, tendo a variedade O’Neal apenas atingido valores de atividade antioxidante mais elevados no ensaio de sequestro do peróxido de hidrogénio. O facto de ambas as cultivares terem sido produzidas com a mesma técnica de cultivo, no mesmo ano e na mesma região, elimina os efeitos de diferenças climatéricas, níveis de radiação UV, temperatura ambiente, “stress” hídrico, composição do solo e disponibilidade de fatores nutricionais. Da mesma forma, tendo ambas as variedades sido colhidas com o grau de maturação adequado à sua comercialização, terem sido transportadas para o laboratório em iguais condições e analisadas da mesma forma, elimina as divergências devidas a diferentes graus de maturação ou de processos analíticos. Assim, as diferenças observadas para os parâmetros analisados devem-se principalmente a diferenças genéticas entre as cultivares Earliblue e O’Neal.

A comparação entre os resultados obtidos, nos diversos ensaios realizados, com a variedade O’Neal produzida em duas regiões distintas mostra que, de facto, os fatores ambientais e o modo de produção também podem influenciar a composição em fenóis e, consequentemente, as propriedades bioativas dos mirtilos. Assim, de uma forma geral a variedade O’Neal produzida na zona de Grândola apresentou sempre valores inferiores de fenóis, antocianinas e atividade antioxidante. De qualquer modo, o efeito dos fatores ambientais e do modo de cultivo parece ter um impacto muito menor nas propriedades bioativas dos frutos do que o efeito do estado de maturação.

As diferenças verificadas com a variedade O'Neal produzida na Mirtisul e na Mirtilusa podem refletir as diferenças de clima, condições de solo e de cultivo que se verificam entre as duas zonas de produção. Diversos trabalhos têm apontado o cultivo em condições de agricultura biológica como um fator que potencia o aumento do teor dos mirtilos em fenóis e, em particular, em antocianinas (Wang *et al.*, 2008; You *et al.*, 2011). No entanto, neste trabalho parecem ser os mirtilos de agricultura convencional os que apresentam teores em fenóis mais elevados e propriedades antioxidantes mais acentuadas. Desta forma, ou variedade O'Neal não é tão sensível aos métodos de cultivo como as variedades estudadas pelos outros autores, nomeadamente as variedades Bluecrop e diversas variedades "Rabbiteye", ou as diferenças de clima e/ou tipo de solo tiveram uma influência mais marcante no teor em fenóis totais do que o modo de cultivo. Para tentar discriminar entre estes dois fatores seria necessário realizar este estudo no mesmo local, variando apenas o modo de cultivo, ou em locais diferentes mas mantendo o modo de produção.

Neste trabalho foi possível detetar a existência de atividade antioxidante e de atividade antimutagénica nas duas variedades de mirtilos estudadas. No entanto, a extrapolação dos resultados obtidos em ensaio *in vitro* para a situação *in vivo*, tem que ser cuidadosamente ponderada, uma vez que a manutenção das propriedades verificadas *in vitro* depende de vários fatores, como, por exemplo, do facto dos compostos por elas responsáveis resistirem ao processo de digestão gastrointestinal, serem absorvidos pelas células do intestino e não serem rapidamente inativados nem pelas bactérias da flora intestinal, nem pelas enzimas de biotransformação humanas. Para se poder ponderar a extrapolação dos resultados seriam necessários estudos mais aprofundados sobre a biodisponibilidade dos compostos bioativos dos mirtilos estudados.

A absorção digestiva dos polifenóis parece variar dependendo da sua estrutura, o que faz com que nem sempre sejam os polifenóis mais abundantes nos alimentos aqueles que podem atingir maiores concentrações no interior das células humanas. As isoflavonas e o ácido gálico parecem ser os polifenóis mais bem absorvidos, seguidos pelas catequinas, flavanonas e glicosídeos de quercetina. As catequinas galato e as proantocianidinas parecem ser os polifenóis de mais difícil absorção (Manach *et al.*, 2005). Apesar da absorção dos fenóis poder ser limitada, alguns estudos, efetuados em voluntários humanos saudáveis, mostram que após a ingestão de mirtilos a capacidade antioxidante do plasma aumenta, verificando-se, igualmente um aumento dos níveis plasmáticos dos ácidos caféico e ferúlico. A presença do ácido cafeico, detetada no plasma, e não na matriz dos mirtilos, sugere que este possa resultar da hidrólise do ácido clorogénico ocorrida durante a digestão gastrointestinal (Serafini *et al.*, 2009).

Um importante contributo para possibilitar a extrapolação dos resultados obtidos para a situação real *in vivo* seria a realização de ensaios sobre a resistência ao processo de digestão, a

possibilidade de absorção e sobre a biotransformação dos compostos bioativos presentes nestes mirtilos.

Seria, igualmente, interessante estudar o perfil em compostos fenólicos das diferentes amostras de mirtilo para tentar estabelecer correlações entre as atividades biológicas e a presença ou ausência de compostos específicos. Este tipo de análise permitiria identificar os principais compostos bioativos das amostras. Outra possibilidade seria o uso de outros tipos de mutagêneos no teste de Ames, por exemplo, mutagêneos indiretos, uma vez que, que neste trabalho se testou apenas a proteção dos mirtilos contra um mutagêneo direto, o *tert*-butilhidroperóxido.

Também seria muito interessante o estudo das bactérias presentes na flora dos mirtilos estudados por forma a verificar alguma ação positiva, ou negativa, sobre as capacidades antioxidantes detetadas neste estudo. Esta possível linha de investigação surge na sequência da identificação, na flora natural de mirtilos, de uma bactéria, a *Serratia vaccinii*, capaz de biotransformar o sumo de mirtilo, acentuando o seu teor em compostos fenólicos e a sua capacidade antioxidante, parecendo potenciar as suas capacidades anti-inflamatórias, antidiabéticas e de proteção contra doenças neurodegenerativas (Vuong *et al.*, 2010).

## 6. Referências Bibliográficas

- Aguiló A, Tauler P, Fuentespina E, Tur JA, Córdova A & Pons A (2005) Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiology & Behavior*, **84**, 1-7.
- Al-Gubory KH, Fowler PA, & Garrel C (2010) The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **42(10)**, 1634-1650.
- Alvarez-Jubete HW, Arendt EK & Gallagher E (2010) Polyphenol composition and *in vitro* antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. *Food Chemistry*, **119**, 770-778.
- Ames BN (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science*, **221**, 1256-1264.
- Angelo PM & Jorge N (2007) Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, **66(1)**, 232-240.
- Antunes L & Araújo M (2000) Mutagenicidade e antimutagenicidade dos principais corantes para alimentos. *Revista de Nutrição*, **13(2)** 81-88.
- Apak R, Güçlü K, Özyürek M & Karademir SE (2004) Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 7970-7981.
- Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir SE & Altun M (2005) Total antioxidant capacity assay of human serum using copper(II)-neocuproine as chromogenic oxidant: The CUPRAC method. *Free Radical Research*, **39(9)**, 949–961.
- Apel K & Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, **55**, 373-99.
- Asres K, Sporer F & Win M (2004) Patterns of pyrrolizidine alkaloids in 12 Ethiopian *Crotalaria* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, **32**, 915-930.
- Benzie IFF & Strain JJ (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, **239**, 70–76.
- Bhathena SJ & Velasquez MT (2002) Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **76**, 1191–1201.

- Bishop JM (1991) Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, **64**, 235–248.
- Bunea A, Rugină D, Pinteș A, Sconța Z, Bunea CI & Socăciu C (2011) Comparative polyphenolic content and antioxidant activities of some wild and cultivated blueberries from Romania. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, **39(2)**, 70-76.
- Buonocore G, Perrone S, & Tataranno ML (2010) Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, **15(4)**, 186-190.
- Claeys W, Vleeschouwer K & Hendrick E (2005) Quantifying the formation of carcinogens during food processing: acrylamide. *Trends in Food Science & Technology*, **16**, 181-193.
- Connor AM, Luby JJ, Tong CBS, Finn CE & Hancock JF (2002) Genotypic and environmental variation in antioxidant activity, total phenolic content, and anthocyanin content among Blueberry Cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **127(1)**, 89–97.
- Deaton CM & Marlin DJ (2003) Exercise-associated oxidative stress. *Clinical Techniques in Equine Practice*, **2**, 278-291.
- Di Sotto A, Mastrangelo S, Romussi G, Bisio A & Mazzanti G (2009) Antimutagenic activity of a secoisopimarane diterpenoid from *Salvia cinnabarina* M. Martens et Galeotti in the bacterial reverse mutation assay. *Food Chemical Toxicology*, **47**, 2092-2096.
- Dorman HJD, Bachmayer O, Koşar M & Hiltunen R (2004) Antioxidant properties of aqueous extracts from selected *Lamiaceae* species grown in Turkey. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **52**, 762–770.
- Dorman HJD, Koşar M, Kahlos K, Holm Y & Hiltunen R (2003) Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **51**, 4563–4569.
- Drabik-Markiewicz G, Van den MK, De Mey E, Deprez S, Kowalska T & Paelinck H (2009) Role of proline and hydroxyproline in *N*-nitrosamine formation during heating in cured meat. *Meat Science*, **81**, 479-486.
- Duarte MPAC (2008) Desenvolvimento de novos sistemas de *Escherichia coli* competentes em biotransformação humana: Aplicação no estudo da metabolização de xenobióticos mediada pelos citocromos P450. Dissertação de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

- Dunlap W, Llewellyn L, Doyle J & Yamamoto Y (2003) A microtiter plate assay for screening antioxidant activity in extracts of marine organisms. *Marine Biotechnology*, **5**(3), 294–301.
- Duthie SJ (2007) Berry phytochemicals, genomic stability and cancer: Evidence for chemoprotection at several stages in the carcinogenic process. *Molecular Nutrition & Food Research*, **51**, 665–674.
- Dutra CB, Rath S & Reyes GR (2007) Nitrosaminas voláteis em alimentos. *Alimentos e Nutrição*, **18**(1), 111-120.
- Ehlenfeldt M & Prior R (2001) Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of highbush blueberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **29**, 2222-2227.
- Esmaeili MA & Sonboli A (2010) Antioxidant, free radical scavenging activities of *Salvia brachyantha* and its protective effect against oxidative cardiac cell injury. *Food Chemistry Toxicology*, **48**, 846–853.
- Ferguson LR (2001) Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*, **475**, 89-111.
- Ferguson L & Philpott M (2008) Nutrition and mutagenesis. *Annual Review of Nutrition*, **28**, 313-329.
- Ferguson LR, Philpott M & Karunasinghe N (2004) Dietary cancer and prevention using antimutagens. *Toxicology*, **198**, 147-159.
- Ferreira ICFR & Abreu R (2007) Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. *Bioanalise*, **IV**(2), 32-39.
- Fonseca & Oliveira (2007) A planta de mirtilo: Morfologia e fisiologia. *Divulgação AGRO*, **556** (2), 1-27.
- Geckil H, Ates B, Durmaz G, Erdogan S & Yilmaz I (2005) Antioxidant, free radical scavenging and metal chelating characteristics of propolis. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, **1**, pp 27–31
- Gigante B, Santos C, Silva AM, Curto MJM, Nascimento MSJ, Pinto E, Pedro M, Cerqueira F, Pinto MM, Duarte MP, Laires A, Rueff J, Gonçalves J, Pegado MI & Valdeira ML (2003) Catechols from abietic acid: synthesis and evaluation as bioactive compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **11**, 1631-1638.

- Giovanelli G & Buratti S (2009) Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties. *Food Chemistry*, **112**, 903–908.
- Goldman R & Shields PG (2003) Food Mutagens. *The Journal of Nutrition*, **133(3)**, 965S-973S.
- Gough RE (1991) *The Highbush Blueberry and Its Management*. Food Production Press, Haworth Press, Inc. New York.
- Gülçin I (2012) Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, **86(3)**, 345-91.
- Halliwell B & Chirico S (1993) Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **57(suppl5)**, 715S-724S.
- Hasty P (2005) The impact of DNA damage, genetic mutation and cellular responses on cancer prevention, longevity and aging: observations in humans and mice. *Mechanisms of Ageing and Development*, **126**, 71-77.
- Hipólito-Reis C (2008) Vinho, gastronomia e saúde. 1ª ed. Editora da Universidade do Porto, Porto, Portugal, 460 p.
- Holst B & Williamson G (2008) Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current Opinion in Biotechnology*, **19(2)**, 73-82.
- Huang D, Ou B & Prior RL (2005) The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 1841-1856.
- Ji LL, Chen Y & Wang ZT (2008) The toxic effect of pyrrolizidine alkaloid clivorine on the human embryonic kidney 293 cells and its primary mechanism. *Experimental and Toxicologic Pathology*, **60**, 87-93.
- Joseph JA, Shukitt-Hale B & Casadesus G (2005) Reversing the deleterious effects of aging on neuronal communication and behavior: beneficial properties of fruit polyphenolic compounds. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **81(suppl)**, 313S–316S.
- Joseph JA, Shukitt-Hale B & Lau FC (2007) Fruit polyphenols and their effects on neuronal signaling and behavior in senescence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1100**, 470–485.
- Kaiser HM (2010) An Economic Analysis of Domestic Market Impacts of the U.S. Highbush Blueberry Council, August 14, disponível em <http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/getfile?dDocName=STELPRDC5088425>.



- Kalt W (2005) Effects of production and processing factors on major fruit and vegetable antioxidants. *Journal of Food Science*, **70(1)**, R11-R19.
- Kalt W, Forney CF, Martin A & Prior RL (1999) Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 4638–4644.
- Kalt W, Lawand C, Ryan D, Mcdonald J, Donner H & Forney C (2003) Oxygen radical absorbing capacity, anthocyanin and phenolic content of Highbush Blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) during ripening and storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **128(6)**, 917-923.
- Kalt W, Ryan DAJ, Duy JC, Prior RL, Ehlenfeldt MK & Vander-Kloet SP (2001) Interspecific variation in anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity among genotypes of Highbush and Lowbush Blueberries (*Vaccinium cyanococcus* spp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 4761-4767.
- Koca I & Karadeniz B (2009) Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea Region of Turkey. *Scientia Horticulturae*, **121**, 447–450.
- Kohen R & Nyska A (2002) Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology*, **30(6)**, 620-650.
- Koşar M, Göger F & Başer KHC (2008) *In vitro* antioxidant properties and phenolic composition of *Salvia virgata* Jacq. from Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, pp 2369-2374.
- Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, Griel AE & Etherton TD (2002) Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, **113**, pp 71S-88S.
- Lazarou D, Grougnet R, Athanasio & Papadopoulos A (2007) Antimutagenic properties of a polyphenol-enriched extract derived from sesame-seed perisperm. *Mutation Research*, **634**, 163-171.
- Lee J, Durst RW & Wrolstad RE (2005) Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. *JAOAC International*, **88**, pp 269-1278.
- Lidon F & Silvestre M (2010) *Princípios alimentação de nutrição humana*. Escolar Editora, Lisboa, Portugal. 647 p.

- Magalhães LM, Segundo MA, Reis S & Lima JLFC (2008) Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, **613**(1), 1-19.
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A & Rémésy C (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **81**(1), 230S-242S.
- Maron DM & Ames BN (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity testing. *Mutation Research*, **113**, 173–215.
- Martineau LC, Couture A, Spoor D, Benhaddou-Andaloussi A, Harris C, Meddah B, Leduc C, Burt A, Vuong T, Le PM, Prentki M, Bennett SA, Arnason JT & Haddad PS (2006) Anti-diabetic properties of the Canadian lowbush blueberry *Vaccinium angustifolium* Ait. *Phytomedicine*, **13**, 612-623.
- Micelli N, Trovato A, Dugo P, Cacciola F, Donato P, Marino A, Bellinghieri V, La Barbera TM, Güvenç A & Taviano MF (2009) Comparative analysis of flavonoid profile, antioxidant and antimicrobial activity of the berries of *Juniperus communis* L. var. *communis* and *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. from Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 6570–6577.
- Migliore L & Coppédé F (2009) Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. *Mutation Research*, **674**, 73-84.
- Moon J-K & Shibamoto T (2009) Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 1655–1666.
- Mortelmans K & Zeiger E (2000) The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, **455**, 29–60.
- Moyer R, Hummer K, Finn C, Frei B & Wrolstad R (2002) Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 519-525.
- Nakamura S, Kato A & Kobayaahit K (1992) Enhanced antioxidative effect of ovalbumin due to covalent binding of polysaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **40**, 2033-2037.
- Nakasugi T, Nakashima M & Komai K (2000) Antimutagens in Gaiyou (*Artemisia argyi* Levl. et Vant.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 3256-3266.

- Neto A, Dias JCM, Arbilla G, Oliveira LF & Barek J (2000) Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) e seus derivados nitrados (NHPAS): uma revisão metodológica. *Química Nova*, **23**(6), 765-773.
- Neto C (2007) Cranberry and blueberry: Evidence for protective effects against cancer and vascular diseases. *Molecular Nutrition & Food Research*, **51**, 652–664.
- Ou B, Hampsch-Woodill M & Prior RL (2001) Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 4619-4626.
- Perron NR & Brumaghim JL (2009) A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding. *Cell Biochemistry and Biophysics*, **53**, 75-100.
- Prior RL, Cao G, Martin A, Sofic E, McEwen J, O'Brien C, Lischner N, Ehlenfeldt M, Kalt W, Krewer G & Mainland CM (1998) Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 2686-2693.
- Prior RL, Wu X & Schaich K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**(10), 4290-4302.
- Pufulete M, Battershill J, Boobis A & Fielder R (2004) Approaches to carcinogenic risk assessment for polycyclic aromatic hydrocarbons: a UK perspective. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **40**, 54-66.
- Ramful D, Bahorun T, Bourdon E, Tarnus E, Aruoma OI (2010) Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of mauritian citrus fruits: Potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology*, **278**, pp 75-87.
- Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahana DK & Kumar MNVR (2006) Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, **113**(3), 189-207.
- Rieger M (2006) *Introduction to fruit crops*. Binghamton: Food Products, Haworth Press, Inc. 462 p.
- Santos C (2007) *Estatística Descritiva - Manual de Auto-aprendizagem*. Lisboa.
- Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C & Jimenez L (2005) Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **45**(4), 287-306.

- Schechter A, Birnbaum L, Ryan JJ & Constable JD (2006) Dioxins: An overview. *Environmental Research*, **101**, 419-428.
- Serafini M, Testa MF, Villaño D, Pecorari M, Wieren K, Azzini E, Brambilla A & Maiani G (2009) Antioxidant activity of blueberry fruit is impaired by association with milk. *Free Radical Biology & Medicine*, **46**, 769–774.
- Serrado F, Pereira M, Freitas S, Martins S & Dias T (2008) Mirtilos guia de boas práticas para produção, promoção e comercialização. Disponível em [http://www.mirtilusa.com/manual\\_mirtilo.pdf](http://www.mirtilusa.com/manual_mirtilo.pdf).
- Shukitt-Hale B, Carey AN, Jenkins D, Rabin BM & Joseph JA (2007) Beneficial effects of fruit extracts on neuronal function and behavior in a rodent model of accelerated aging. *Neurobiology of Aging*, **28**, 1187–1194.
- Sies H (1997) Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, **82(2)**, 291-295.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, **299**, 152-178.
- Skupień K (2006) Chemical composition of selected cultivars of highbush blueberry fruit (*Vaccinium corymbosum* L.). *Folia Horticulturae*, **18**, pp 47–56.
- Sorg O (2004) Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *Comptes Rendus Biologies*, **327(7)**, 649-662.
- Soto AM & Sonnenschein C (2010) Environmental causes of cancer: endocrine disruptors as carcinogens. *Nature Reviews Endocrinology*, **6**, 363-70.
- Smith M, Marley KA, Seigler D, Singletary KW & Meline B (2000) Bioactive properties of wild blueberry fruits. *Journal of Food Science – Sensory and Nutritive Qualities of Food*, **65(2)**, 352–356.
- Steffen LM, Jacobs Jr DR, Stevens J, Shahar E, Carithers Y & Folsom AR (2003) Associations of whole-grain, refined-grain, and fruit and vegetable consumption with risks of all-cause mortality and incident coronary artery disease and ischemic stroke: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *American Journal of Clinical Nutrition*, **78**, 383–90.
- Trehane J (2004) *Blueberries, Cranberries and Other Vacciniums*. Royal Horticultural Society, Portland, U.S.A.

- Türkmen I & Eksi A (2011) Brix degree and sorbitol/xylitol level of authentic pomegranate (*Punica granatum*) juice. *Food Chemistry*, **127**(3), 1404-1407.
- USDA (2010) National nutrient database for standard reference, Release 23 disponível em [http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list\\_nut\\_edit.pl](http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl), acedido em Janeiro de 2012.
- USDA (2011) Database for the flavonoid content of selected foods, Release 3, disponível em [http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/Flav/Flav\\_R03.pdf](http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/Flav/Flav_R03.pdf), acedido em Janeiro de 2012.
- Valentão P, Fernandes E, Carvalho F, Andrade PB, Seabra RM Bastos ML (2001) Antioxidant activity of *Centaurium erythraea* infusion evidenced by Its superoxide radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 3476-349.
- Valentová K, Ulrichová J, Cvak L & Simánek V (2007) Cytoprotective effect of a bilberry extract against oxidative damage of rat hepatocytes. *Food Chemistry*, **101**, 912-917.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M & Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **39**, 44-84.
- Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J & Pérez-Alvarez JA (2008) Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Journal of Food Science*, **73**, pp 117-124.
- Vuong T, Matar C, Ramassamy C & Haddad PS (2010) Biotransformed blueberry juice protects neurons from hydrogen peroxide-induced oxidative stress and mitogen-activated protein kinase pathway alterations. *British Journal of Nutrition*, **104**, 656-663.
- Wang SY, Chen C-T, Sciarappa W & Camp MJ (2008) Fruit quality, antioxidant capacity, and flavonoid content of organically and conventionally grown blueberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 5788-5794.
- Wang SY & Jiao H (2000) Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 140-146.
- Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH & Loeb LA (2004) Environmental and chemical carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, **14**, 473-486.
- Yen GC & Chen HY (1995) Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**(1), pp 27-32.

- You Q, Wang B, Chen F, Huang Z, Wang X & Luo PG (2011) Comparison of anthocyanins and phenolics in organically and conventionally grown blueberries in selected cultivars. *Food Chemistry*, **125**, pp 201–208.
- Zadernowski R, Naczek M & Nesterowicz J (2005) Phenolic acid profiles in some small berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 2118-2124.
- Zafra-Stone S, Yasmin T, Bagchi M, Chatterjee A, Vinson JA & Bagchi D (2007) Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Molecular Nutrition & Food Research*, **51**, pp 675–683.

## Portais da Internet

- <http://www.noticiasdeaveiro.pt/pt/20994/aumento-da-producao-de-mirtilo-impulsiona-cluster-dos-pequenos-frutos/>, acedido em Janeiro de 2012.
- <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>, acedido em Janeiro de 2012.
- <http://www.growingproduce.com/article/26272/trends-in-world-blueberry-production>, acedido em Janeiro de 2012.
- [http://www.observatorioagricola.pt/item.asp?id\\_item=115](http://www.observatorioagricola.pt/item.asp?id_item=115), acedido em Janeiro de 2012.
- <http://ddr.nal.usda.gov/bitstream/10113/3159/1/IND43938883.pdf>, acedido em Janeiro de 2012.
- <http://www.fao.org/DOCREP/003/Y1899E/y1899e08.htm#TopOfPage>, acedido em Janeiro de 2012.
- <http://www.meteo.pt/pt/oclima/normais.clima/1981-2010/001/>, acedido em Janeiro de 2012.
- <http://www.meteo.pt/pt/oclima/normais.clima/1981-2010/019/> acedido em Janeiro de 2012
- [http://www.inrb.pt/fotos/editor2/inia/manuais/folha\\_sfp.pdf](http://www.inrb.pt/fotos/editor2/inia/manuais/folha_sfp.pdf), acedido em Janeiro de 2012
- <http://sniamb.apambiente.pt/webatlas/>, acedido em Janeiro de 2012.
- [http://www.fallcreeknursery.com/documents/uploads/Ripening\\_Chart\\_poster.pdf](http://www.fallcreeknursery.com/documents/uploads/Ripening_Chart_poster.pdf), acedido em Janeiro de 2012.
- [http://www.fallcreeknursery.com/nursery/variety/nursery\\_northern-highbush](http://www.fallcreeknursery.com/nursery/variety/nursery_northern-highbush), acedido em Janeiro de 2012.
- [http://www.mirtilusa.com/cat\\_a5\\_mirtilusa\\_2011.pdf](http://www.mirtilusa.com/cat_a5_mirtilusa_2011.pdf), acedido em Janeiro de 2012.